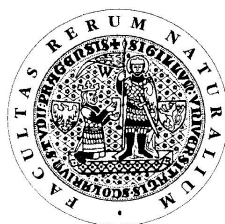


Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Václav Ševčík

Vývoj a optimalizace SPE metody pro prekoncentraci a stanovení
fluorotelomerních alkoholů ve vodách

Development and optimization of SPE method for preconcentration
and determination of fluorotelomeric alcohols in water

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14.5.2012.

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval mému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. a Mgr. Miroslavě Bursové za trpělivost a rady poskytnuté během měření a vypracovávání této práce. Dále pak rodičům za umožnění studia a podporu poskytovanou během studií.

Abstrakt

V této práci byla vyvinuta a pokročilými statistickými metodami optimalizována GC metoda s hmotnostní detekcí a SPE prekoncentračním krokem pro stanovení fluorotelomerních alkoholů ve vodných vzorcích. Jako analyty byly zvoleny 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-oktanol (6:2 FTOH) a 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-dekanol (8:2 FTOH). V průběhu optimalizace metody pro GC byl současně testován vliv faktorů jako je objem vzorku, tlak nosného plynu, počáteční teplota analýzy, čas dávkování vzorku a teplota injektoru na velikost odezvy. Pomocí statistického programu Minitab 16 a série měření byla nalezena optima významných faktorů a vhodný druh ionizace pro oba analyty. Limity detekce GC-MS metody jsou 0,24 ng/mL pro 6:2 FTOH a 0,42 ng/mL pro 8:2 FTOH. Pro SPE prekoncentraci byly testovány faktory jako druh kondicionačního činidla a jeho objem, rychlost kondicionace, rychlost průtoku vzorku, způsob sušení kolony, druh elučního činidla a jeho objem. Pomocí programu Minitab 16 byly určeny optimální hodnoty těchto faktorů. Sledováním závislosti výtěžku extrakce SPE na objemu a koncentraci zásobního roztoku bylo pro stanovení fluorotelomerních alkoholů za daných experimentálních podmínek určeno omezení maximálního objemu vzorku (400 mL) a minimální koncentrace roztoku (100 pg/mL).

Předmětová slova

Plynová chromatografie, extrakce, optimalizace

Klíčová slova

Fluorotelomerní alkoholy, extrakce na pevné fázi, metodologie odezvové plochy

Abstract

New GC-MS method combined with SPE preconcentration step has been developed and optimized for the determination of selected fluorotelomer alcohols in aqueous samples by advanced statistical method in this thesis. 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-octanol (6:2 FTOH) and 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-decanol (8:2 FTOH) have been selected as the analytes. The influence of several factors, such as the sample volume, the carrier gas pressure, the sampling time and the injector temperature on the system response have been studied during the optimization. Utilizing the statistical software Minitab 16 and series of experiments, the optimal values of relevant factors and a suitable type of ionization were found for both analytes. Limits of detection of GC-MS method are 0.24 ng/mL for 6:2 FTOH and 0.42 ng/mL for 8:2 FTOH. Several factors, such as the type and the volume of conditioning agent, the speed of conditioning, the speed of sample flow, the method of column drying, the type and the volume of eluent have been tested for SPE. The optima of these factors were determined using Minitab 16 software. The extraction efficiency dependence on the concentration and volume of the stock solution was used to set the limitation of SPE for the determination of fluorotelomer alcohols. The maximum volume of sample equals to 400 mL and the minimum concentration equals to 100 pg/mL for the used experimental conditions.

Subject words

Gas chromatography, extraction, optimization

Keywords

Fluorotelomer alcohols, solid-phase extraction, response surface methodology

Obsah

1. Úvod.....	- 9 -
2. Teoretická část	- 10 -
2.1. Názvosloví, terminologie	- 10 -
2.2. Perfluoroalkylované sloučeniny	- 10 -
2.3. Fluorotelomerní alkoholy	- 11 -
2.3.1. Druhy matric a způsoby stanovení.....	- 14 -
2.4. Optimalizace	- 17 -
2.4.1. OVAT	- 17 -
2.4.2. Vícerozměrné statistické postupy	- 17 -
3. Experimentální část.....	- 25 -
3.1. Chemikálie	- 25 -
3.2. Použitý materiál a zařízení	- 25 -
3.3. Postup práce	- 26 -
3.3.1. Příprava roztoků.....	- 26 -
3.3.2. Optimalizace GC metody.....	- 27 -
3.3.3. Postup optimalizace SPE	- 27 -
3.3.4. Postup extrakce	- 27 -
3.3.5. LLE pro kontrolu odpadních roztoků po SPE	- 28 -
3.3.6. Analýza GC – MS.....	- 28 -
3.3.7. Vyhodnocování experimentálních výsledků.....	- 28 -
4. Výsledky a diskuze	- 29 -
4.1. Kalibrační závislosti.....	- 29 -
4.2. Optimalizace metody GC.....	- 30 -
4.2.1. Výběr kolony	- 30 -
4.2.2. Výběr způsobu ionizace.....	- 30 -
4.2.3. Screening pro GC metodu s elektronovou ionizací	- 31 -

4.2.4.	Tvorba modelu pro GC metodu s EI – Box-Behnken design	- 34 -
4.2.5.	Nalezení optimálních hodnot	- 38 -
4.2.6.	Testování ionizací dle poměru S/N.....	- 39 -
4.2.7.	Testování různých typů linerů	- 42 -
4.2.8.	Optimalizace tlaku methanu pro negativní chemickou ionizaci	- 43 -
4.3.	Optimalizace SPE.....	- 44 -
4.3.1.	Výběr typu sorbentu pro SPE	- 44 -
4.3.2.	Screening pro HLB	- 45 -
4.3.3.	Optimální hodnoty pro SPE.....	- 48 -
4.3.4.	Konečné úpravy extraktu	- 49 -
4.3.5.	Závislost výtěžku extrakce na koncentraci analytů v roztoku	- 50 -
4.3.6.	Závislost výtěžku extrakce na objemu vzorku.....	- 51 -
4.4.	Problémy při analýze a jejich řešení	- 52 -
4.4.1.	Štěpení píků při použití methanolu	- 52 -
4.4.2.	Deformace píků při použití acetonitrilu.....	- 52 -
4.4.3.	Návrhy možných řešení problémů	- 53 -
5.	Shrnutí.....	- 55 -
6.	Závěr	- 56 -
7.	Použitá literatura	- 57 -

Seznam použitých zkratk a symbolů

6:2 FTOH	1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-oktanol
8:2 FTOH	1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-dekanol
ACN	Acetonitril
CCD	Central Composite Design
EI	Electron Ionization, druh ionizace u plynové chromatografie
FID	Flame Ionization Detector, typ detektoru pro plynovou chromatografii
FTOAcr	Fluorotelomer akrylát
FTOMEthacr	Fluorotelomer methakrylát
GC	Gas Chromatography, plynová chromatografie
GC-MS NCI	Plynová chromatografie s negativní chemickou ionizací a hmotnostní detekcí
HLB	Typ sorbentu pro extrakci pevnou fází
LC-APPI-MS/MS	Kapalinová chromatografie s dvojitou hmotnostní detekcí a atmosférickou fotoionizací
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s dvojitou hmotnostní detekcí
LLE	Liquid liquid extraction, extrakce kapaliny kapalinou
LOD	Limit of detection, limit detekce
LOQ	Limit of quantification, limit stanovitelnosti
MeOH	Methanol
MTBE	Methyl Tertiary Butyl Ether, methyl 2,2-dimethylpropyl ether
OVAT	One Variable At a Time, druh optimalizace
PCI	Positive Chemical Ionization, druh ionizace u plynové chromatografie
PFOA	Perfluorooctanoic acid, kyselina perfluorooktanová
RSM	Response Surface Methodology, druh optimalizace
SIM	Single Ion Monitoring, druh hmotnostní detekce
S/N	Signal/Noise ratio, poměr signál/šum
SPE	Solid – Phase Extraction, extrakce pevnou fází
XAD-2	Druh polymerního adsorbentu pro extrakci pevnou fází

1. Úvod

Fluorotelomerní alkoholy jsou zástupci široké skupiny vysoce fluorovaných sloučenin. Za více než padesátileté období jejich používání, kdy byly využívány nejen jako suroviny pro výrobu polymerů a povrchově aktivních látek, se rozšířily snad do všech oblastí životního prostředí. Výskyt těchto polutantů byl potvrzen i v místech vzdálených od průmyslových oblastí a lidského osídlení.

Zájem o sledování tohoto typu sloučenin je podložen dřívějšími zjištěními, že degradací těchto látek mohou vznikat perfluorované karboxylové kyseliny. Tyto vysoce perzistentní polutanty se pak nadále zadržují v životním prostředí. Mnohé z nich jsou prokázanými karcinogeny.

Koncentrace fluorotelomerních alkoholů ve vodách jsou v řádech pg/mL, proto je jejich záchyt a stanovení s využitím standardních metod obtížné a mnohdy nelze využít obvyklé postupy.

Cílem této práce je vývoj a optimalizace metody pro GC analýzu a optimalizace účinnosti prekoncentrace adsorpcí na pevné fázi, jako ekologičtější a levnější varianty ke klasické extrakci kapaliny kapalinou, pro stanovení fluorotelomerních alkoholů (6:2 a 8:2 FTOH) pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Posledním krokem práce pak bude ověření použitelnosti optimalizované SPE prekoncentrace na reálných vzorcích říční vody.

2. Teoretická část

2.1. Názvosloví, terminologie

Vzhledem ke složitosti a nejednotnosti v názvosloví vysoce fluorovaných a perfluorovaných sloučenin bylo v této práci zachováno názvosloví uvedené ve zdrojových publikacích. Z tohoto důvodu nemusí odpovídat aktuálním doporučením pro tvorbu názvů pro tuto skupinu látek.

Z důvodu neexistujícího, nepřesně popisujícího nebo neustáleného českého názvosloví bylo pro popis optimalizací a některých termínů týkajících se plynové chromatografie použito originálního anglického názvosloví, případně běžně užívaných, ale triviálních termínů.

2.2. Perfluoroalkylované sloučeniny

Monitoring životního prostředí, sledování kontaminantů a vyhledávání jejich zdrojů je v současné době jeden z nejvíce řešených a diskutovaných problémů. Nalezení zdroje kontaminace pak následně umožňuje objasnit trasu chemikálie v přírodě a cesty vstupu do potravního řetězce. Mezi často sledované chemikálie patří i perfluoroalkylované sloučeniny.

Perfluoroalkylované sloučeniny jsou širokou skupinou látek zahrnující polyfluorované a perfluorované kyseliny, sulfonáty a neiontové sloučeniny jako jsou fluorotelomerní alkoholy, perfluorované sulfonamidy a další deriváty [1].

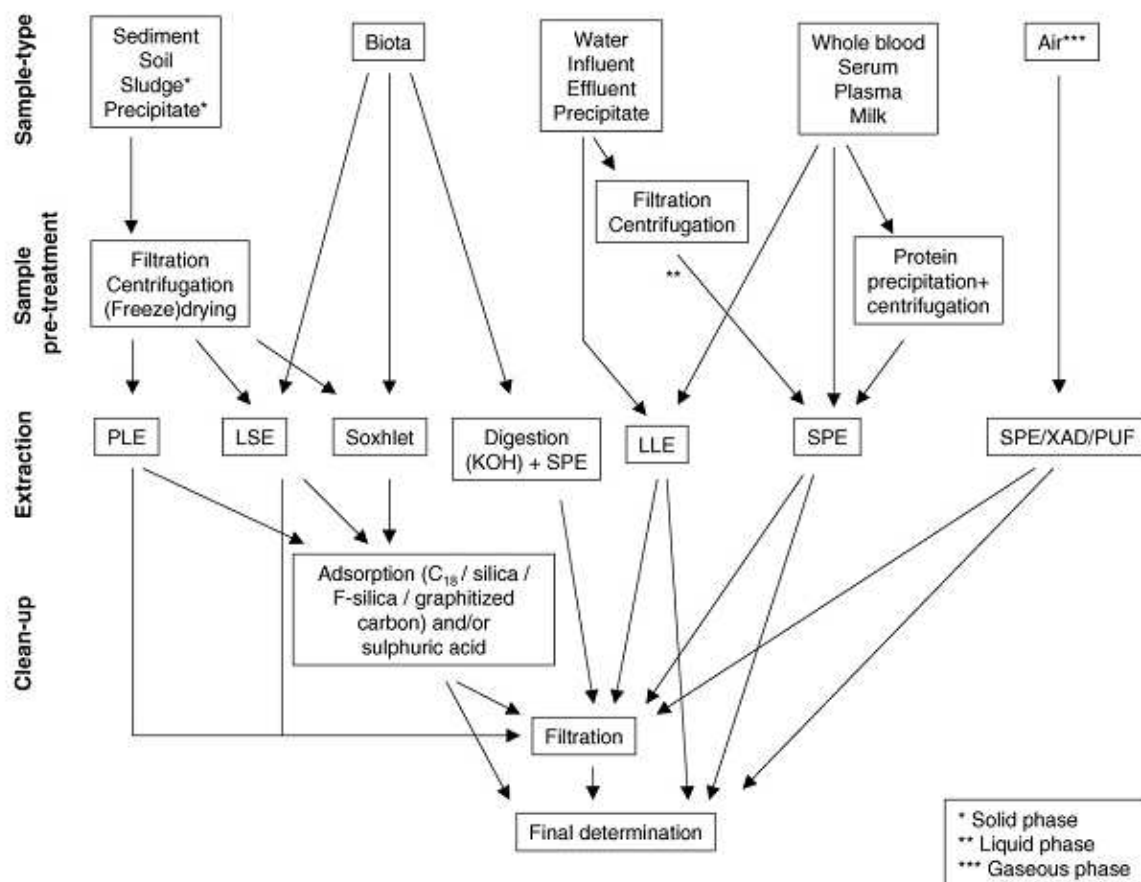
Díky svým jedinečným fyzikálně-chemickým vlastnostem našly tyto chemikálie uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích a právě masivní využívání způsobilo jejich všudypřítomnost.

Jedním z jejich zdrojů jsou průmyslové a městské čističky odpadních vod, skládky tuhých a kapalných odpadů. Transportním médiem jsou pak řeky a oceány [2-11].

Těkavé sloučeniny uvolňované při výrobním procesu jsou sorbovány na prachové částice a unášeny do velmi vzdálených oblastí.

Mnoho studií dokázalo jejich přítomnost v zemědělských půdách, rostlinách i živých organismech [12-14]. Ačkoliv jsou zvýšené hladiny těchto kontaminantů pozorovány převážně v hustě obydlených nebo průmyslových oblastech, byla jejich přítomnost několikrát prokázána i v arktických oblastech a organizmech v nich žijících [15-17].

Vzhledem k množství a druhům matric, ve kterých se tyto látky nacházejí, bylo vyvinuto mnoho metod, sloužících k jejich zachytu a stanovení. Způsoby předúpravy vzorků a možné druhy extrakčních metod jsou zobrazeny na obrázku 1.



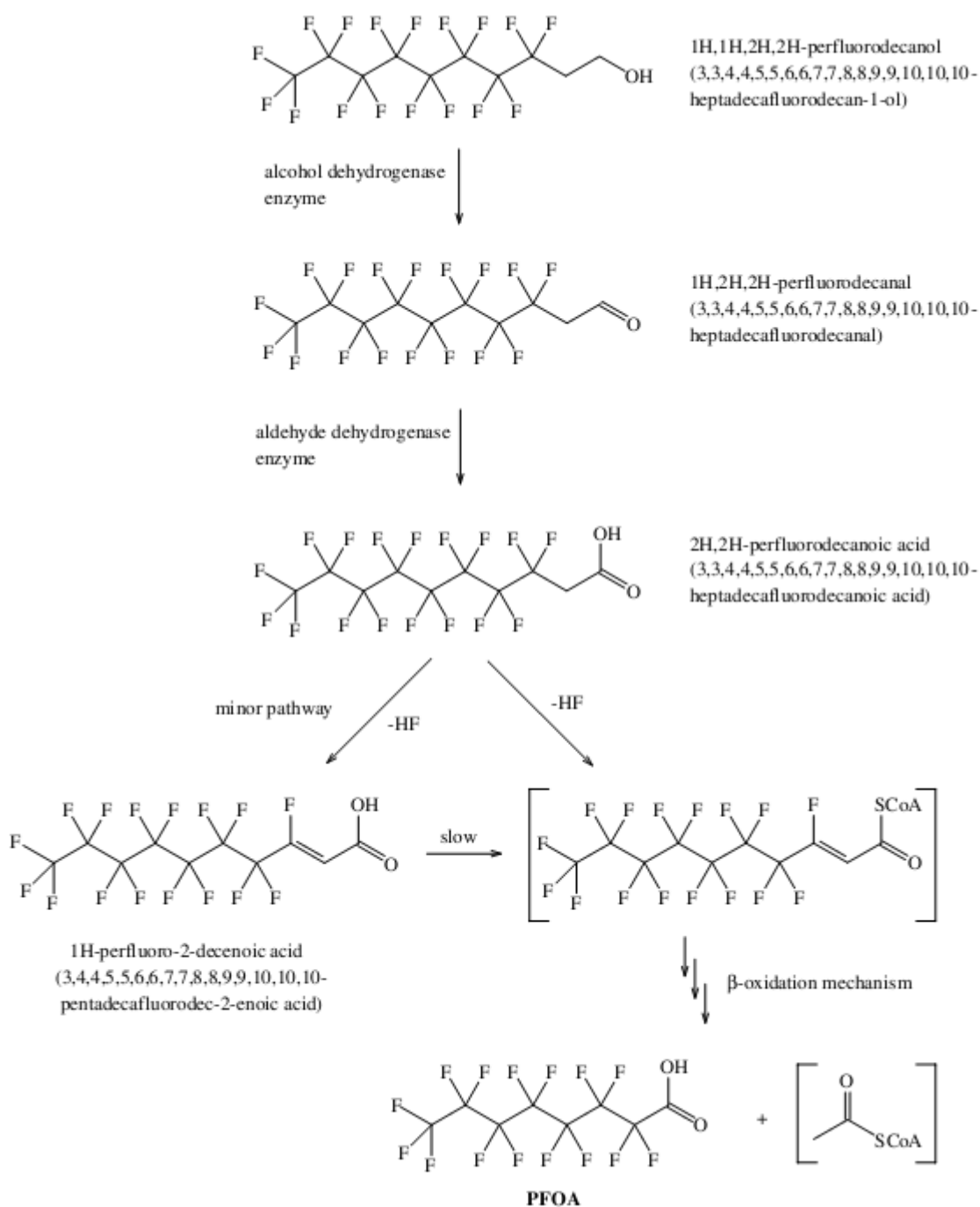
Obrázek 1 – Možné způsoby úpravy vzorků a extrakce pro perfluoroalkylované sloučeniny [1]

2.3. Fluorotelomerní alkoholy

Fluorotelomerní alkoholy (FTOHs) jsou lineární fluorotelomery s dlouhým řetězcem a alkoholovou funkční skupinou. Strukturní vzorec je obecně popsán rovnicí: $C_xF_{2x+1}CH_2CH_2OH$, často se však používá zjednodušený zápis X:Y FTOH, kde X je počet fluorovaných uhlíků a Y počet hydrogenovaných, např. 6:2 FTOH odpovídá 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-oktanolu.

FTOHs se užívají jako suroviny pro výrobu povrchově aktivních látek i polymerů a často jsou v nich přítomny v nízkých koncentracích jako nezreagované zbytky výchozích látek.

FTOHs nacházejí využití nejen jako prekurzory, ale také jako různé odstraňovače skvrn, odmašťovače skel, jsou součástí barev, inkoustů, lepidel, vosků a dalších vodoodpudivých přípravků [18]. Dřívější analýzy prokázaly, že atmosférickou oxidací či mikrobiální degradací těchto látek může vznikat PFOA (viz obr. 2) a jiné perfluorované karboxylové kyseliny, které se pak nadále zadržují v životním prostředí. Povrchové vody mohou být kontaminovány mokrou depozicí ze vzduchu nebo z průmyslových čistíren [19].

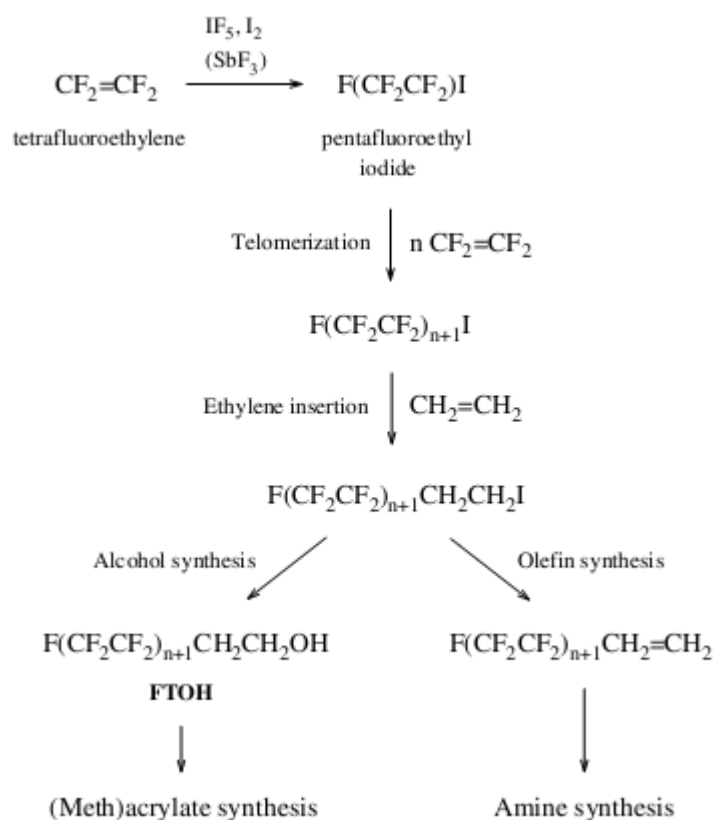


Obrázek 2 – Proces biologické degradace fluorotelomerních alkoholů [20]

Syntéza fluorotelomerních alkoholů (viz obr. 3) probíhá za účasti mnoha tetrafluoroethylenových monomerů, reagujících s pentafluoroethyl jodidovým telogenem za tvorby oligomeru. Fluorovaný jodid následně podstoupí adici ethylenu za vzniku organojodové směsi jako produktu schopného dalších syntéz. V posledním kroku je terminální jodid nahrazen hydroxylovou skupinou za tvorby příslušného fluorotelomerního alkoholu [20].

Roční celosvětová produkce byla v roce 2005 odhadnuta na 5 – 6,5 tisíc tun, z toho zhruba 40 % v severní Americe [18].

Bylo zjištěno, že díky fyzikálně-chemickým vlastnostem těchto látek je nutné použít jiný analytický přístup, než u ostatních perfluorovaných sloučenin jako jsou kyseliny nebo sulfonáty [21].



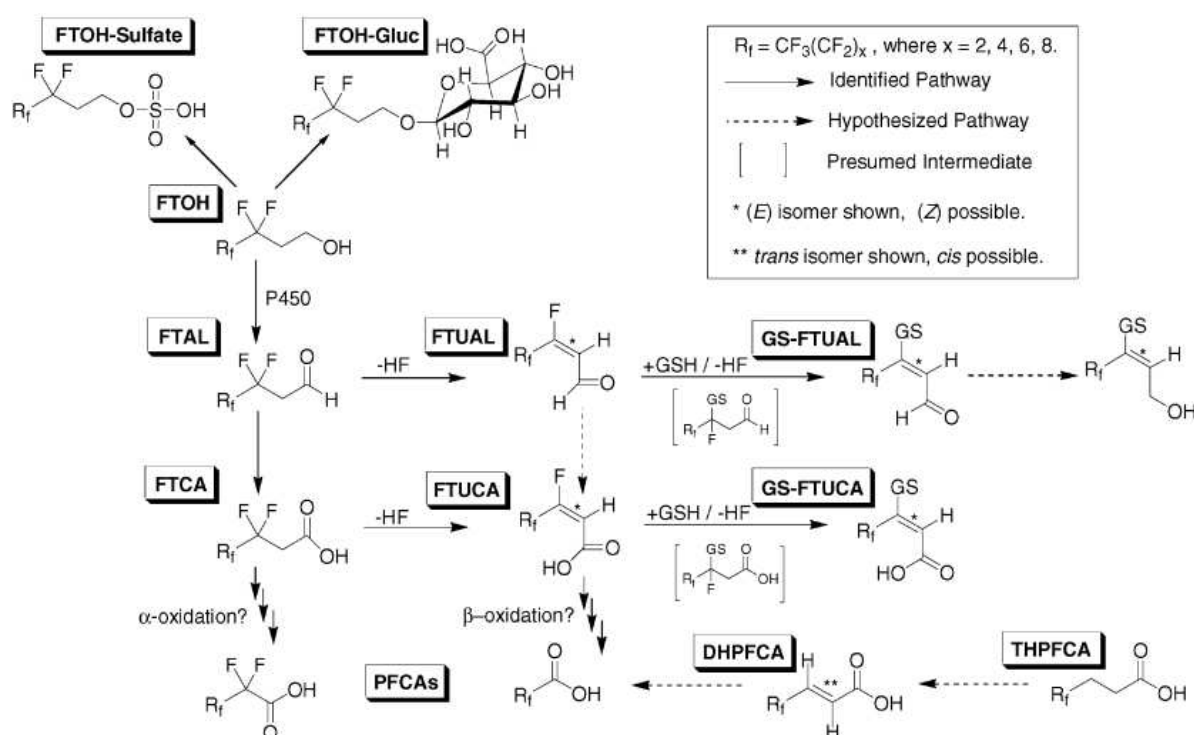
Obrázek 3 – Schéma průmyslové syntézy fluorotelomerních alkoholů [20]

2.3.1. Druhy matric a způsoby stanovení

Biologické vzorky

Většina publikací o výskytu alkoholů byla v dřívějších letech převážně zaměřena na vzduch nebo pevné matrice, až v posledních letech se objevila řada výzkumů zabývajících se obsahem FTOHs v živých organismech a jejich osudem v nich [22-26].

Martin a kol. ve své publikaci [27, 28] podrobně popsali metabolické produkty a cestu fluorotelomerních alkoholů v organismu na izolovaných krysích játrech (viz obr. 4). K extrakci byl použit diethyl ether, stanovení bylo provedeno kapalinovou chromatografií s dvojitou hmotnostní detekcí.



Obrázek 4 – Metabolické přeměny fluorotelomerních alkoholů v izolovaných krysích játrech [27]

Henderson a kol. [29] se zaměřil na vývoj metody ke stanovení 8:2 FTOH a jeho metabolitů v biologických vzorcích savců pomocí LLE extrakce MTBE a analýzou pomocí GC-MS (NCI).

Szostek a Prickett [21] validovali metodu pro stanovení 8:2 FTOH ve zvířecí plazmě a tkáních. Standardní provedení extrakce kapalinou pro takto komplexní matrice, jako jsou tkáně, se ukázalo nedostatečně efektivní. Z důvodu nemožnosti odpařit rozpouštědlo nebo jej vyměnit za jiné a také díky silnému efektu matrice, způsobujícímu kontaminaci

a značný pokles citlivosti, byla po extrakci hexanem jako čistící operace využita metoda SPE.

Chu a kol. [22] se zabývali stanovením fluorotelomerních alkoholů v Arktidě, ve vzorcích jater ledních medvědů, vejcích buňáka ledního a alkouna tlustozobého pomocí LC-APPI-MS/MS.

Vodné matrice

Problematika stanovování fluorotelomerních alkoholů ve vodných matricích je o poznání složitější než v případě jiných perfluorovaných sloučenin. Hlavním důvodem je jejich velmi nízká koncentrace (v řádech jednotek pg/mL) a atypické fyzikálně-chemické vlastnosti. Extrakční metodou, používanou pro získání těchto látek z vodných vzorků, je extrakce kapaliny kapalinou pomocí vhodného organického rozpouštědla.

Mahmoud a kol. [30] popsali metodu pro stanovení stopových množství 6:2 FTOH, 8:2 FTOH, 10:2 FTOH, 8:2 FTOAcr a 8:2 FTOMethacr pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Jako extrakční metoda byla využita LLE s terc-butyl methyl etherem s prekoncentračním faktorem 1000 a výtěžky extrakcí se pohybovaly od 58 do 78%. Detekční limity pro hledané analyty byly: 0,5; 0,2; 0,2; 0,05 a 0,1 pg/mL (6:2 FTOH, 8:2 FTOH, 10:2 FTOH, 8:2 FTOAcr a 8:2 FTOMethacr). Metoda byla testována na reálných vzorcích dešťové, povrchové, říční vody a výtocích z čističek odpadních vod v průmyslových oblastech Japonska. Výskyt 8:2 FTOH a 10:2 FTOH byl potvrzen ve většině odebraných vzorků. Nejvyšší zjištěné koncentrace byly ve vzorcích z čističek odpadních vod (17,4 a 5,08 pg/mL), následovaly vzorky povrchové vody (9,17 a 1,09 pg/mL), indikující částečnou účinnost čištění pro tento druh látek. Koncentrace v dešťové vodě byly $1,96 \pm 0,69$ pg/mL (8:2 FTOH) a $0,82 \pm 0,33$ pg/mL (10:2 FTOH).

Szostek, Prickett a Buck [31] vyvinuli a validovali metodu pro stanovení 6:2, 8:2 a 10:2 FTOH ve vodných matricích pomocí LC-MS a LC-MS/MS. Byly testovány 2 extrakční metody – LLE rozpouštědlem s vodou mísitelným (ACN) a nemísitelným (MTBE). Měření bylo prováděno na modelových vzorcích vod z různých zdrojů (řeky, studny, rybníky), při různých koncentračních hladinách standardů (10; 30 a 100 ng/mL). Získané limity detekce byly 0,09 (6:2 FTOH), 0,09 (8:2 FTOH) a 0,06 ng/mL (10:2 FTOH) při použití LC-MS/MS, 1,2; 0,9 a 1,2 ng/mL při použití LC-MS. Při srovnání LOD je patrné, že použitím násobné hmotnostní detekce je nárůst citlivosti zhruba desetinásobný.

Gauthier a Mabury [32] popsali mechanismus fotolýzy a chování 8:2 FTOH ve vodných matricích různého složení. Testovaným prostředím byly roztoky 10 mM H₂O₂, 100 µM H₂O₂ a jezerní voda. Poločasy rozpadu pro výše uvedená prostředí byly: $0,83 \pm 0,2$ h; $38,0 \pm 6,0$ h a $93,2 \pm 10,0$ h. Hlavním produktem rozpadu byl 8:2 fluorotelomerní aldehyd, 8:2 fluorotelomerní karboxylová kyselina a perfluorooktanoát.

Vzduch

Vysoká těkavost charakteristická pro fluorotelomerní alkoholy je předpokladem pro dálkový transport těchto látek atmosférou [33]. Počet studií, zabývajících se vývojem metod a sledováním koncentrací těchto analytů ve vzduchu [10, 34-38], a důkazy existence i ve vzorcích odebraných mimo průmyslové nebo osídlené lokality [39, 40] naznačují, že vzduch je jedním z hlavních transportních médií pro transport tohoto druhu látek.

Jahnke a kol. [41, 42] se zabývali vývojem, srovnáním a aplikací metod pro stanovení těkavých polyfluorovaných sloučenin ve vzorcích vnitřního i venkovního vzduchu. K prekoncentraci byly využity SPE kolonky, filtry ze skelných vláken a sendvičové absorbéry z polyurethanové pěny a XAD-2 pryskyřice. Podle typu analytu byla ke stanovení koncentrace použita GC-MS (neutrální analyty) nebo LC – MS (iontové sloučeniny).

Pevné matrice

Testování půdních vzorků na obsah alkoholů je neméně důležité než v ostatních matricích. Výsledky testů rovněž přinášejí informace o způsobu degradace těchto látek [43, 44], o produktech degradace [45] a spolu s výsledky z ostatních druhů matric doplňují informace o vlastnostech a umožňují tak získat ucelený přehled o zdrojích kontaminace a způsobech transportu těchto látek v životním prostředí.

Ellington a kol. [46] optimalizovali metodu pro extrakci a stanovení FTOHs v půdních vzorcích pomocí GC – MS (PCI). Jako extrakční činidlo byl použit MTBE.

Spotřební produkty

Sinclair a kol. [47] prokázali zbytkové koncentrace PFOA a FTOHs v novém teflonovém nádobí. Fluorotelomerní alkoholy byly nalezeny v plynné fázi, při zahřátí na teploty běžně využívané při přípravě pokrmů, zejména při prvním použití [48]. Následné testy však neprokázaly přítomnost FTOHs při druhém, ani dalším použití.

2.4. Optimalizace

Optimalizací se rozumí zlepšování výkonnosti systému, procesu nebo produktu k dosažení maximálního užitku z něj. Termín optimalizace je v analytické chemii chápán jako souhrnné označení pro zjišťování experimentálních podmínek, jejichž použitím je získána maximální odezva [49].

2.4.1. OVAT

V analytické chemii byl optimalizační postup nejčastěji prováděn sledováním vlivu jednoho faktoru v čase na odpověď systému. Zatímco hodnota jednoho parametru byla proměnná, hodnoty ostatních byly udržovány na konstantní úrovni. Tato technika se v Angličtině nazývá one-variable-at-a-time (OVAT) [49]. Mezi hlavní nevýhody tohoto postupu patří vyřazení možného vlivu vzájemných interakcí mezi testovanými proměnnými. Dalšími nevýhodami jsou nárůst počtu experimentů nutných ke zjištění požadovaných hodnot většího počtu faktorů a z toho vyplývající větší spotřeba materiálu a časová náročnost. V případě chromatografických technik, kdy je třeba optimalizovat vliv více parametrů na více než jednu odezvu, např. intenzitu signálu a rozlišení píků, je tento postup značně neefektivní.

Díky těmto nevýhodám se postupně začaly nejen v chemii využívat vícerozměrné statistické metody [49]. Nárůst počtu vědeckých prací s aplikováním techniky plánování experimentů dokazuje stále větší oblibu této techniky a široké možnosti jejího využití [50].

2.4.2. Vícerozměrné statistické postupy

Chromatografická analýza obvykle zahrnuje tyto tři kroky: přípravu vzorku, separaci složek a jejich stanovení [51]. Příprava vzorku a separace složek bývá často optimalizována pomocí vícerozměrných statistických metod.

Pro názvosloví těchto technik je definována řada termínů, nejběžnější z nich jsou uvedeny níže:

Experimentální design – je specifický soubor experimentů, definovaný maticí tvořenou kombinacemi různých úrovní studovaných faktorů [49].

Faktory – jsou experimentální proměnné, které lze měnit nezávisle na sobě. Například teplota, průtoková rychlost, tlak [52].

Úrovně faktorů – zvolený rozsah hodnot, použitých při měření.

Odezva – Naměřená hodnota, získaný výsledek z experimentu.

Metodologie odezvové plochy (RSM, response surface methodology)

Je to soubor statistických a matematických metod založených na sestavení polynomicke rovnice z experimentálních dat, která popisuje chování tohoto systému v závislosti na experimentálních podmínkách (faktorech). Patří mezi nejpoužívanější vícerozměrné techniky [53].

Proces multifaktorové optimalizace lze rozdělit na tyto části:

1. Screening (prvotní testování)

Ve screeningu se nejprve volí druh odezvy a následně jsou vybrány faktory, které budou zahrnuty do experimentu. Hodnoty faktorů volíme tak, aby bylo možné měřit vliv hodnoty na odezvu.

Při výběru experimentálního designu je nutné zvolit kompromis mezi časovou a finanční náročností tak, aby zvolený návrh obsáhl potřebné faktory a zároveň nebyl příliš experimentálně náročný [54].

Vždy je výhodnější zahrnout více možných faktorů do prvního testování (screeningu), než je později přidávat. Z tohoto důvodu je nutné promyslet, jak zvolené faktory nejlépe definovat [55]. Právě z důvodu efektivity a hospodárnosti se často volí frakční dvojúrovňové faktorové designy.

V této fázi je nutné pomocí znáhodnění (randomizace) zabránit nesprávnému odhadu vlivu jednotlivých faktorů, aby nedošlo k falešnému určení důležitosti faktorů. Záměrná opakování přináší informace o chybách a tím zlepšuje možnost odhadu efektu pro jednotlivé faktory.

Další podmínkou pro úspěšnou tvorbu experimentálního designu je kodifikace. Kodifikací se rozumí převedení všech studovaných hodnot faktorů, které se mohou řádově lišit, na bezrozměrné hodnoty, čímž je umožněno porovnání jejich vlivu na odezvu systému a statistické vyhodnocení.

Z naměřených dat se pomocí statistických metod provede vyhodnocení vlivu jednotlivých faktorů a jejich interakcí. Cílem je najít faktory mající statisticky významný vliv a následně získat matematickou rovnici popisující chování systému v testovaných úrovních.

Pro faktory nemající statisticky významný vliv, tj. jejichž nastavení významně neovlivňuje odezvu, se použije takové nastavení, které je pro experiment nejjednodušší nebo pomůže snížit náklady [56].

Druhy experimentálních designů (návrhů):

Směšové návrhy (Mixture designs)

Nacházejí uplatnění v situacích, kdy je třeba řešit zastoupení několika složek směsi tak, aby bylo dosaženo požadovaných vlastností, například při návrhu poměrů rozpouštědel v mobilní fázi pro HPLC. Od ostatních návrhů se odlišují optimalizací extenzivních veličin [51]. V praxi mohou být použity jak pro návrh složek pohybujících se v určitém rozmezí, tak pro složky s nevymezenými hranicemi.

Optimální návrhy

Jsou používány v případech, kdy není možné provést všechny experimenty navržené statistickým programem z důvodu nedostatku nebo vysoké ceny materiálu, časové náročnosti apod. Výběr experimentů je prováděn tak, aby nedošlo k přílišnému snížení informace o testované odezvě [56].

Faktorové návrhy (Factorial designs)

Jsou využívány k hledání statisticky významných faktorů v experimentech.

- *Jednofaktorové návrhy*

Patří mezi nejjednodušší návrhy. Umožňují pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) efektivněji srovnat rozdílnost nebo nerozdílnost faktorů než při použití T-testu pro různě volené dvojice.

- *Vícefaktorové návrhy*

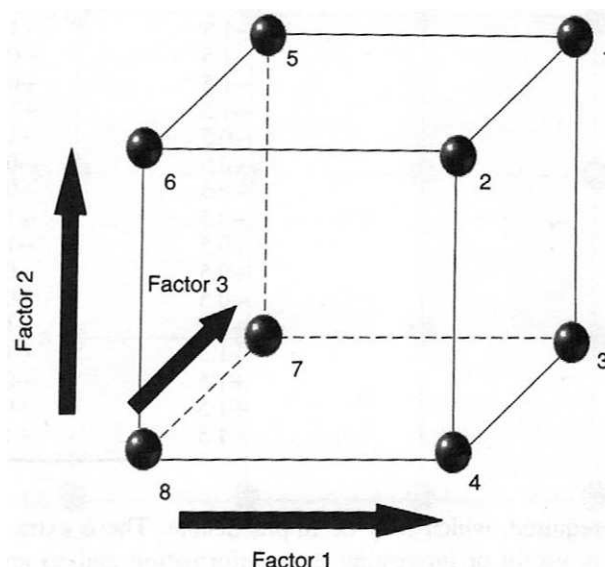
Kvůli požadavku co nejlépe prostudovat vlivy jednotlivých faktorů, či jejich interakci na studovaný experiment, je nutné využít vícefaktorové návrhy. V případě úplných faktorových návrhů (full factorial designs) dochází k provedení všech možných kombinací úrovní zvolených faktorů, což je výhodné pro popis experimentu, ale náročné na čas a náklady.

Počet nezbytných experimentů lze vypočítat podle rovnice:

$$N = L^k$$

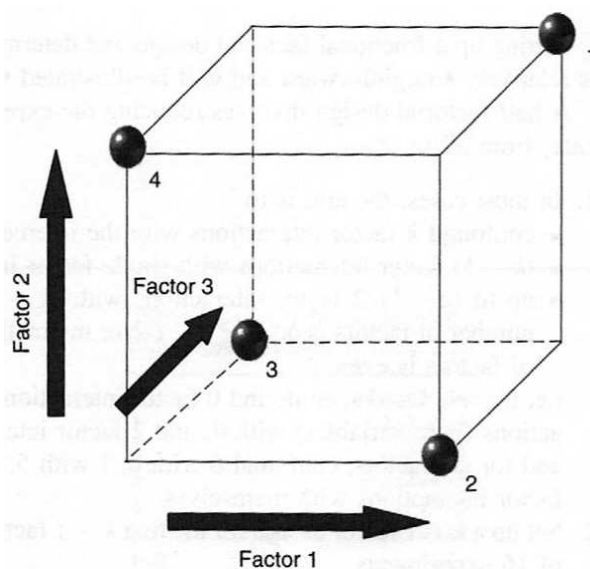
kde N je počet experimentů; L je počet úrovní faktoru a k je rovno počtu sledovaných faktorů.

2^k je často používaný typ vícefaktorového návrhu, přičemž z výše uvedené rovnice vyplývá, že pro tento typ návrhu jsou jednomu faktoru přiřazeny právě 2 úrovně, kódované jako -1 a 1 (schéma – viz obr. 5). Mohou být popsány jak kvalitativně (druh chemikálie, způsob provedení operace), tak kvantitativně (tlak, teplota, pH) [57].



Obrázek 5 – Schéma úplného dvouúrovňového třífaktorového návrhu [58]

Frakční faktorové návrhy (fractional factorial design) (schéma – viz obr. 6) jsou výhodné pro otestování interakcí většího počtu faktorů, kdy by při použití 2^k docházelo k obrovskému množství experimentálních měření. Jsou založeny na zanedbání vlivu interakcí třetího a vyššího řádu, které jsou velmi malé nebo zcela zanedbatelné.



Obrázek 6 – Schéma dílčího dvouúrovňového třífaktorového návrhu [58]

Plackett-Burmanovy návrhy jsou speciálním typem frakčních faktorových návrhů, sloužící ke zjištění pouze statisticky významných faktorů během screeningových měření. Tento design je výhodný pro počet experimentů daný násobkem čtyř, v rozsahu 12 – 48 měření, přičemž počet faktorů musí být vždy o jeden nižší než je počet experimentů [56].

Tvorbu návrhu lze zjednodušeně popsat následovně:

Nejprve je třeba vytvořit experimentální tabulku (viz obr. 8), kde v prvním řádku je všem faktorům přiřazena stejná úroveň (+ nebo -). Druhý až N-tý řádek prvního sloupce je vytvořen pomocí příslušné sekvence + a -, tzv. generátoru (viz obr. 7). Dále je postupováno po sloupcích zleva doprava tak, že poslední prvek generátoru z předchozího sloupce je zapsán na druhý řádek v následujícím sloupci [58]. Pomocí tohoto postupu je vytvořen Plackett – Burman experimentální design (viz obr. 8).

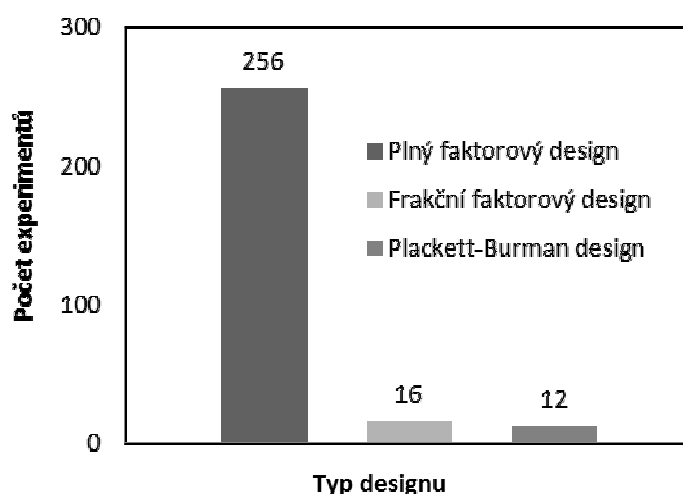
Factors	Generator
7	+++--+-
11	+++--++--+-
15	++++-+-+--+-
19	+++--+++-+--+-
23	++++-+-+--+-

Obrázek 7 – Generátory pro tvorbu Plackett – Burmanova designu [58]

		Factors										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Experiments	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
	3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
	4	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
	5	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
	6	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
	7	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
	8	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	9	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
	10	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
	11	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
	12	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+

Obrázek 8 – Plackett – Burmann experimentální design [58]

Obr. 9 zobrazuje počet experimentů potřebných pro dosažení stejného výsledku pro 8 faktorů při 2 úrovních při využití různých typů experimentálních designů.



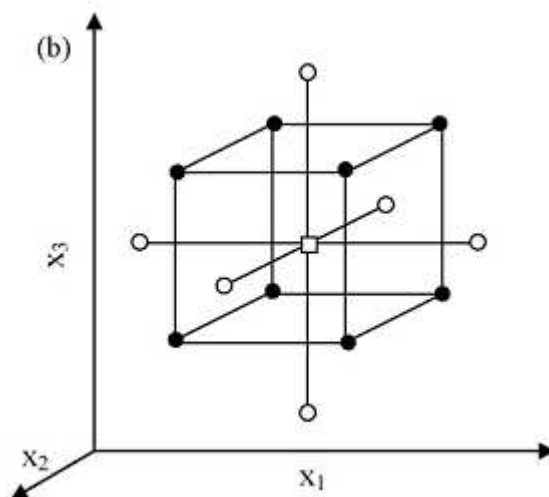
Obrázek 9 – Ukázka závislosti počtu experimentů pro 8 faktorů na 2 úrovních na volbě designu

2. Modelování

Cílem modelování je získat matematický popis systému přesně definující závislost odezvy na hodnotách významných faktorů. Oproti screeningu však dvouúrovňové faktorové návrhy nedostačují k popisu těchto vlastností a z tohoto důvodu jsou pro detailnější popis a vytvoření rovnice používány návrhy zkoumající i vzájemné interakce mezi zjištěnými proměnnými. Central composite design (CCD) a Box – Behnken design jsou široce používané experimentální modely pro odhad a tvorbu polynomického modelu [59, 60].

Central composite design

CCD se vyznačuje několika rysy jako je spojení několika různých designů. Prvním z nich je 2^n plný faktorový design, dalším pak star design používající hodnoty $-\alpha$, 0, $+\alpha$, kde 0 je centrálním bodem, hodnoty alfa jsou nazývány axiální a slouží k určení kvadratického zakřivení viz obr. 10. Posledním rysem CCD je n opakovaných měření v centrálním bodě 0 [49].



Obrázek 10 – CCD pro optimalizaci třech faktorů, ● – body faktoriálního designu, ○ – axiální body (α), □ – centrální bod [49]

Box – Behnken design

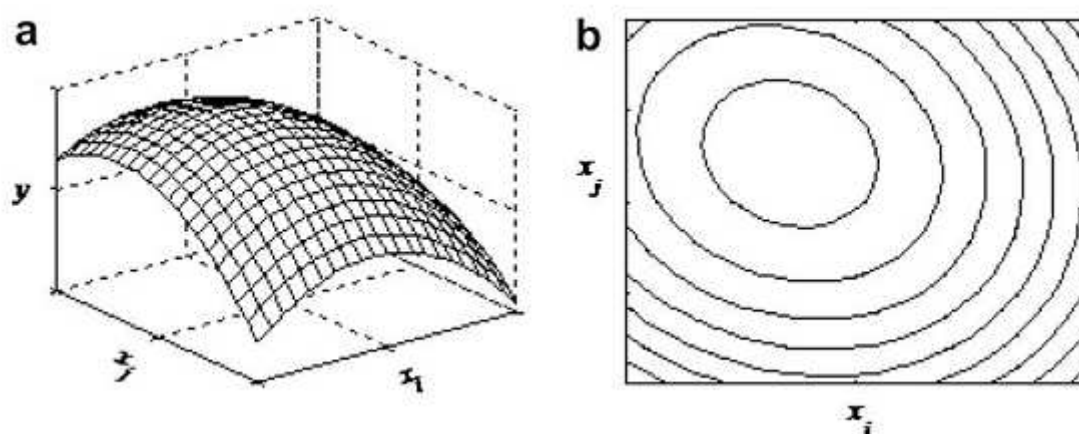
Box-Behnken design rovněž slouží k popisu vlivu faktorů a jejich interakcí na odezvu. Jeho princip je založen na kombinaci frakčních faktoriálních designů s vynecháním axiálních alfa bodů. Z tohoto důvodu je Box – Behnken design používán jako ekonomická alternativa k CCD [59].

Výsledkem obou výše jmenovaných designů je matematická rovnice:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j$$

kde y je odpověď (odezvou systému), β_0 konstantou, β_i lineárním koeficientem, β_{ii} kvadratickým koeficientem, β_{ij} interaktivním koeficientem a x_i je kódovaná úroveň faktoru i .

Tento matematický model popisuje interakce jednotlivých faktorů, jejich působení na odpověď systému a jeho zakřivení na základě výsledků navržených experimentů. Výsledný model může být znázorněn i graficky (viz obr. 11), pomocí 3D nebo plošných grafů.



Obrázek 11 – Grafická znázornění matematického modelu pro 2 faktory a libovolný počet ostatních faktorů nastavených na konstantní hodnoty [59]

3. Optimalizace

Na základě matematického modelu, zjištěného pomocí CCD nebo Box-Behnken designů, je statistickým programem (Derringer nebo Desirability funkce) navrženo optimální nastavení jednotlivých faktorů pro dosažení požadované odezvy [61]. Požadovanou odezvou je myšleno maximum, minimum nebo libovolná konkrétní hodnota. Zjišťování těchto hodnot je relativně složité, neboť Derringerova a Desirability funkce jsou velmi komplexní a jejich popis by přesahoval rozsah této práce.

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Použitými chemikáliemi byly: 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-oktanol (3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoro-1-oktanol, 6:2 FTOH, 97 %), 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-dekanol (3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluoro-1-dekanol, 8:2 FTOH, 97 %), cyklohexanon (99,8 %, GC), propanol (>99 %, GC), 5-nonanol (95 %, GC), hexanol (98 %, GC), oktanol (> 99 %, HPLC), acetonitril (99,9 %, HPLC), všechny od Sigma – Aldrich (Steinheim, Německo).

1-nonanol (> 98 %, GC), acetonitril (99,5 %, GC), terciální butyl methyl ether (MTBE, 98 %, GC) od firmy Fluka (Steinheim, Německo).

Methanol (p.a., 99,9 %, MERCK, Německo), butanol (p.a., Lachema, ČR), 2-methyl-propanol (isobutanol, p.a., 99 %, Penta, ČR), aceton (p.a., 99,98 %, lach:ner, ČR), tetrachlormethan (p.a., Lachema, ČR). Bezvodý Na₂SO₄ (> 99 %, MERCK, Německo). Deionizovaná voda byla odebírána ze zařízení Milli-Q Plus (Millipore), její čistota odpovídá redistilované vodě (18 MΩ).

3.2. Použitý materiál a zařízení

Pro extrakci pevnou fází byly použity SPE kolony HLB a Discovery DSC – NH₂ (obě SupelTM - Select Supelco), Lichrolut – Si, Lichrolut – CN (obě od MERCK), vakuová odsávací souprava pro SPE (Visiprep, Supelco), automatické pipety a mikropipety, třepačka (Vortexgenie 2, Scientific Industries) a blokový termostat (Start, SBH 130DC).

Analyty byly analyzovány pomocí plynových chromatografů GC2010 Plus (Shimadzu) s instalovanou kolonou RTX – 200 MS (3,3,3-trifluoropropylpolysiloxan, Restek), délky 30 m s vnitřním průměrem 0,25 mm a 0,25 μm filmem a GC – 17A s použitím GC MS – QP5050A detektoru (Shimadzu) s instalovanou kolonou DB-5 MS UI (5% fenyl-methylpolysiloxan, Agilent Technologies), délky 30 m s vnitřním průměrem 0,25 mm a 0,25 μm filmem. Jako nosný plyn bylo využito hélium (99,999 %, Linde), reagenčním plynem byl CH₄ (99,9995 %, Linde).

3.3. Postup práce

3.3.1. Příprava roztoků

Standardní roztoky

Byly připraveny jednotlivé roztoky dvou perfluorovaných alkoholů (6:2 FTOH a 8:2 FTOH) o koncentraci 1000 µg/mL v methanolu. Přesně odměřené (6:2 FTOH) a přesně navážené (8:2 FTOH) množství látky bylo kvantitativně převedeno do odměrných baněk ($V = 10$ mL) a doplněno po rysku methanolem. Takto připravené roztoky byly skladovány v chladu a jejich stabilita byla experimentálně ověřována.

Zásobní roztoky

Zásobní roztok perfluorovaných alkoholů byl připravován před samotnou extrakcí vždy čerstvý. Bylo odměřeno požadované množství deionizované vody (100 – 800 mL), přelito do polyethylenové zásobní lahve a do tohoto roztoku byly postupně pipetovány spočítané objemy standardních roztoků obou alkoholů.

Díky řádovým rozdílům mezi objemem deionizované vody (10^2 mL) a pipetovaných objemů standardních roztoků (µL) docházelo k zanedbatelným přírůstkům objemu a z důvodu této zanedbatelné objemové chyby nebylo zapotřebí připravovat zásobní roztoky v odměrné baňce.

Příprava kalibrační řady

Roztoky kalibrační řady byly připravovány ze standardních roztoků alkoholů. Předem vypočítaný objem standardních roztoků obou alkoholů byl pipetován do skleněné vialky s odměřeným objemem rozpouštědla. Vzniklý roztok o požadované koncentraci byl ihned změřen.

Vzhledem k velmi malým objemům roztoků kalibračních řad (150 – 550 µL), omezenému množství standardních roztoků a snaze zamezit nadměrné spotřebě rozpouštědel použitím odměrných baněk s řádově většími objemy, byly roztoky kalibračních řad připravovány přímo ve vialkách pomocí kalibrovaných mikropipet.

Rozdíl v koncentraci roztoku připraveného pomocí výše uvedeného postupu a roztoku připraveného v odměrné baňce byl zanedbatelný.

3.3.2. Optimalizace GC metody

Prvním krokem byla optimalizace separace – tvorba teplotního programu. Pomocí experimentálních měření a dostupných informací byl vytvořen program (viz 3.3.6), vyhovující pro danou analýzu.

Dalším krokem byl výběr faktorů podle jejich předpokládané schopnosti ovlivnit tvar a velikost píků. Z tohoto důvodu byly vybrány tyto faktory: objem vzorku, tlak nosného plynu, počáteční teplota kolony, čas dávkování vzorku a teplota injektoru. Screeningové měření (Plackett-Burman) bylo vyhodnocováno pro výšky píků obou alkoholů. Pro testování vzájemných interakcí významných faktorů byl využit Box – Behnken design.

3.3.3. Postup optimalizace SPE

Na základě informací z literatury, doporučení výrobce kolon a poznatků získaných během práce s extrakční metodou byly k optimalizaci vybrány tyto faktory: kondicionační činidlo a jeho objem, rychlost kondicionace, rychlost průtoku vzorku, sušení kolony, druh elučního činidla a jeho objem. Zjištění vlivu hlavních faktorů bylo provedeno pomocí 1/16 frakčního faktoriál designu.

Výtěžnost extrakce, počítaná jako podíl zjištěné koncentrace v extraktu a teoretické hodnoty koncentrace, získané při 100 %ní účinnosti extrakce, byla zvolena jako odezva. Pro screeningové měření SPE byly použity zásobní roztoky o koncentraci 100 ng/mL a objemu 100 mL. Tyto roztoky byly připravovány čerstvé před samotnou extrakcí. Pro odečet hodnot byla použita tříbodová kalibrační křivka s koncentračním rozsahem 1 – 25 µg/mL.

3.3.4. Postup extrakce

K extrakci byly použity kolony firmy Supelco typ HLB s 200 mg sorbentu. Kondicionace kolony byla prováděna 3 mL acetonitrilu se samovolným průtokem (průtok cca 1 kapka/2s), následně 6 mL deionizované vody stejným průtokem. Zásobní roztok standardů alkoholů byl na kolony přiváděn podtlakem (-50 mBar) s průtokem v rozmezí 12 – 16 mL/min. Po převedení celého objemu kolonou byla kolona 30 minut prosávána dusíkem. Eluce byla prováděna z důvodu zabránění kontaminace samovolným průtokem 3 mL acetonitrilu do 4 mL skleněných vialek. Získaný objem acetonitrilu po eluci, obvykle 2,5 mL (ztráta 0,5 mL je pravděpodobně způsobena solvatací sorbentu), byl postupně

převáděn do kalibrovaných vialek a zakoncentrováván proudem dusíku na 0,8 mL. Takto upravený roztok byl následně použit k analýze na GC – MS.

3.3.5. LLE pro kontrolu odpadních roztoků po SPE

K odpadnímu roztoku ($V = 100$ mL) proteklému SPE kolonkou bylo přidáno 20 mL MTBE. Vzniklý roztok byl ručně vytřepáván v dělicí nálevce po dobu 10 minut. Získaný extrakt byl nejprve vysušen přidáním bezvodého Na_2SO_4 , poté proudem vzduchu zakoncentrován na asi 2 mL a následně změřen na GC – MS.

3.3.6. Analýza GC – MS

Roztok acetonitrilu o objemu 3 μL byl nadávkován za použití techniky vysokotlakého nástřiku (250 kPa) v režimu splitless po dobu 1 minuty, poté byl dělič toku otevřen po celý zbytek analýzy. Počáteční teplota kolony byla nastavena na 46,5 °C a na této hodnotě udržována po dobu 3 minut. Teplotní program dále pokračoval růstem teploty o 20 °C/min na 120 °C a poté o 60 °C na 200 °C a tato teplota byla držena po dobu 2 minut. Průtok kolonou a ostatní veličiny s ním související byly řízeny pomocí módu lineární rychlosti nosného plynu, kde byla nastavena hodnota 35 cm/s a ostatní veličiny nastaveny přístrojem. Injektor byl nastaven na teplotu 230 °C, MS interface na 220 °C a iontový zdroj na 200 °C. Pro negativní chemickou ionizaci byl nastaven tlak reagenčního plynu (CH_4) na hodnotu 200 kPa. Měření probíhalo v módu SIM, při sledování iontů o m/z : 236, 264, 284, 336, 364, 384.

3.3.7. Vyhodnocování experimentálních výsledků

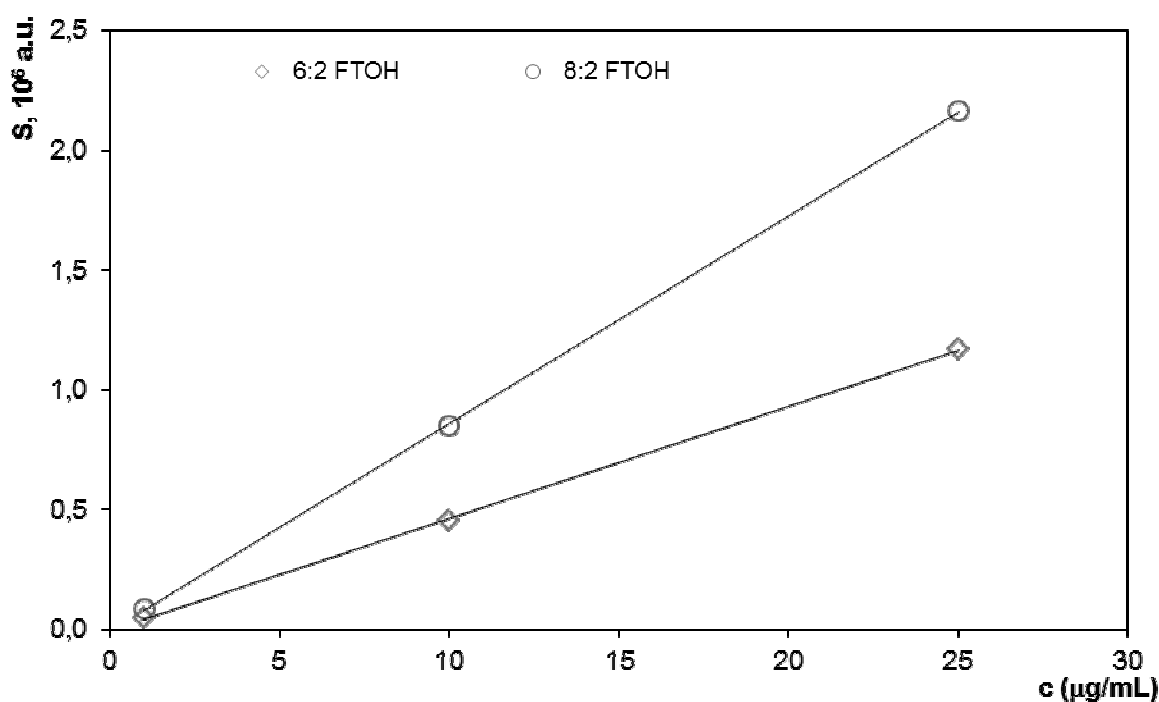
Ke zpracovávání chromatogramů a získání chromatografických veličin (plochy, výšky, poměry S/N) byl využit komerční software GC solution verze 2.7 (Shimadzu). Statistické vyhodnocování těchto dat, tvorba kalibračních závislostí a další operace byly provedeny v tabulkovém procesoru Excel (Microsoft). Tvorba experimentálních designů a vyhodnocování optimalizačních operací bylo prováděno pomocí programu Minitab 16 (Minitab Inc.). Limity detekce byly počítány z poměru S/N a koncentrací roztoků.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Kalibrační závislosti

Z důvodu potřeby různých nástřikových objemů, velkému rozsahu koncentrací, výměnám rozpouštědla a změnám v konfiguraci přístroje byla pro kvantitativní hodnocení experimentů použita absolutní kalibrace s použitím série roztoků. Jednotlivé kalibrační závislosti jsou uvedeny u daných experimentální měření.

Na obrázku 12 je uvedena vzorová kalibrační řada v rozsahu 1 – 25 µg/mL, použitá pro screening SPE pro kolonky HLB a hodnoty koeficientů rovnic lineární regrese ($y = A \cdot x + B$) jsou uvedeny v tabulce 1. Všechny naměřené kalibrační řady byly s korelačními koeficienty od 0,9962 do 0,9999, a proto je lze ve zvoleném rozsahu koncentrací považovat za téměř lineární. Pro dosažení linearitu při měřeních velkých rozsahů koncentrací byla kalibrační řada dělena na více částí.



Obrázek 12 – Vzorová kalibrační závislost jednotlivých alkoholů v rozmezí 1 – 25 µg/mL

Tabulka 1 – Hodnoty regresních a korelačních koeficientů pro vzorovou kalibraci

-	$A \cdot 10^{-3}$	$B \cdot 10^{-3}$	R^2
6:2 FTOH	46,85	-5,82	0,9998
8:2 FTOH	86,75	-8,65	0,9999

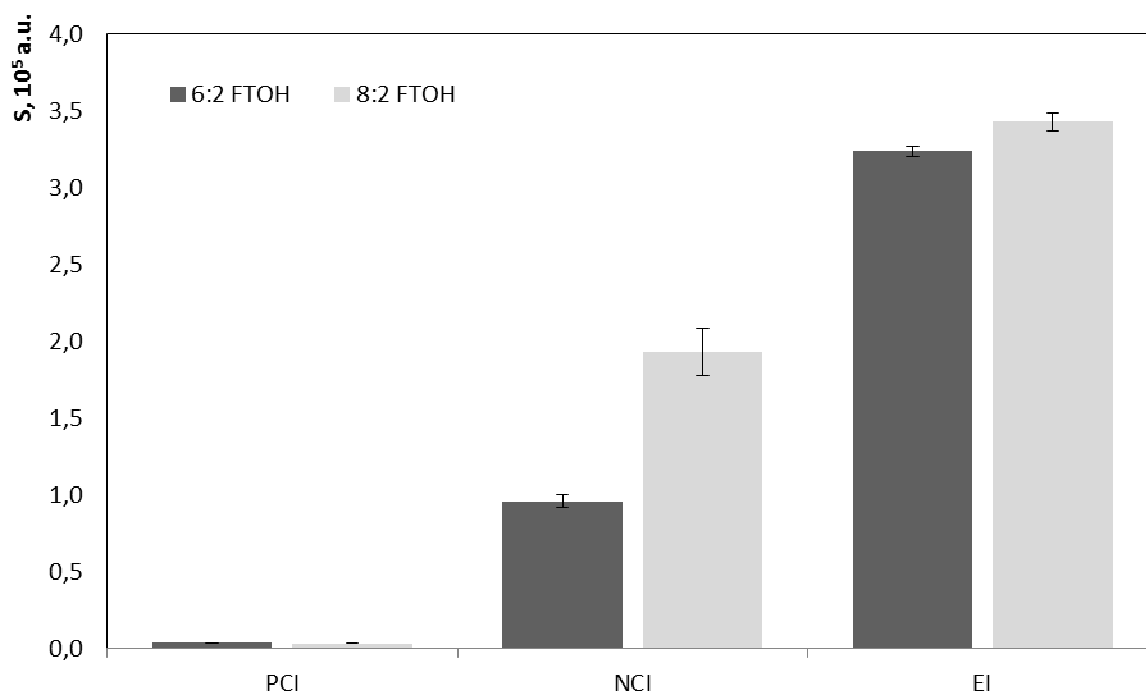
4.2. Optimalizace metody GC

4.2.1. Výběr kolony

Vzhledem k dobrým zkušenostem s použitím kolony RTX – 200 MS při analýze perfluorovaných látek byla pro analýzu fluorotelomerních alkoholů zvolena tato kolona se stacionární fází 3,3,3-trifluoropropylpolysiloxanem.

4.2.2. Výběr způsobu ionizace

Na základě informací uvedených v literatuře a technických možností přístroje byly testovány tyto druhy ionizace: pozitivní chemická (PCI), negativní chemická (NCI) a elektronová ionizace (EI). Testovaný roztok měl koncentraci obou alkoholů 5 $\mu\text{g/mL}$ v methanolu, objem dávkovaného vzorku byl 0,9 μL , nástřik byl proveden v módu splitless s využitím vysokotlakého nástřiku při hodnotě tlaku 150 kPa, detekce probíhala v režimu SIM, v případě chemických ionizací byl tlak reagenčního plynu (CH_4) 250 kPa. Sledovanými fragmenty s příslušnými hodnotami m/z byly pro EI: 31, 65, 95, 127, 131, 344, 363, 405, 463, pro NCI: 236, 264, 284, 336, 364, 284, pro PCI: 327, 365, 393, 427, 465, 493. Fragmenty byly zvoleny na základě předchozího měření stejného vzorku v režimu SCAN a informací z literatury.



Obrázek 13 – Srovnání ionizací vyjádřené plochou píku analytů

Na základě grafického vyhodnocení (viz obr. 13) byla pro největší odezvu vybrána EI. Srovnávacím kritériem byla velikost odezvy, vyjádřená plochou píků. Velikost odezvy u elektronové ionizace byla způsobena zahrnutím fragmentu o m/z 31 ($-\text{CH}_2\text{OH}$). Z tohoto důvodu je odezva výrazně vyšší než u negativní chemické ionizace často používané při analýzách perfluorovaných látek. Výběr ionizace v tomto kroku není definitivní, slouží pouze pro screeningové měření a následné zjištění optimálních podmínek.

4.2.3. Screening pro GC metodu s elektronovou ionizací

Pro zjištění hlavních faktorů ovlivňujících proces analýzy byl zvolen Plackett-Burman design z důvodu nižšího, ale pro popis systému dostačujícího počtu experimentů.

Každému z vybraných faktorů (objem nástřiku, tlak nástřiku, počáteční teplota kolony, čas dávkování vzorku, teplota injektoru) byly přiřazeny dvě kódované úrovně, uvedené v tabulce 2. Zadáním těchto hodnot do statistického programu Minitab 16 byla vytvořena kódovaná tabulka (tabulka 3) sloužící jako systematický postup pro měření.

Vyhodnocení designu bylo prováděno pomocí výšek píku pro každý alkohol zvlášť.

Tabulka 2 – Zvolené parametry pro Plackett-Burman desing

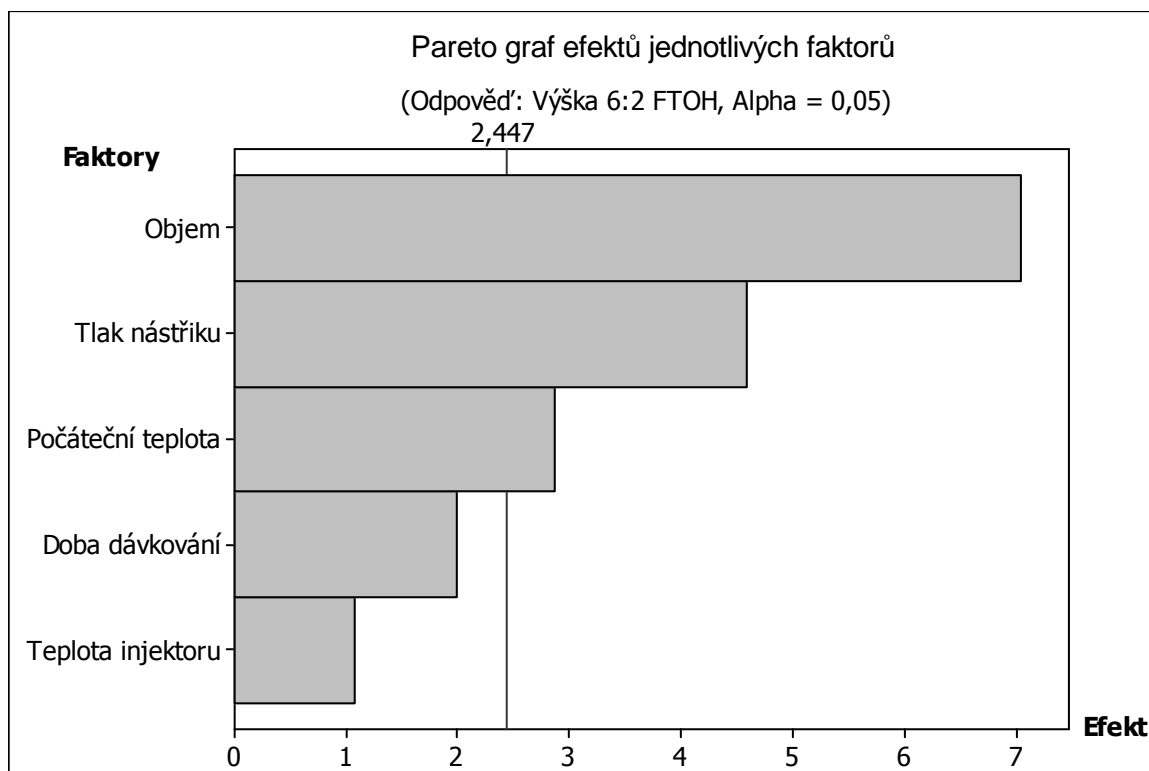
Označení	Faktor	(-)	(+)
A	Počáteční teplota	42 °C	50 °C
B	Tlak nástřiku	50 kPa	150 kPa
C	Objem vzorku	0,5 uL	1,0 uL
D	Teplota injektoru	230 °C	250 °C
E	Doba dávkování	0,5 min	1,0 min

Tabulka 3 – Série pokusů navržená programem Minitab 16 pro Plackett-Burman design

Číslo měření	A	B	C	D	E
1	-	+	+	-	+
2	+	-	+	-	-
3	+	-	+	+	-
4	-	-	+	+	+
5	-	-	-	+	+
6	+	+	-	+	+
7	-	+	-	-	-
8	+	+	-	+	-
9	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	+
11	-	+	+	+	-
12	+	+	+	-	+

Výše uvedená tabulka vygenerovaná statistickým programem neodpovídá vzorovému modelu uvedenému v 2.4.2. z důvodu znáhodnění série měření, standardně využívaného statistickými programy.

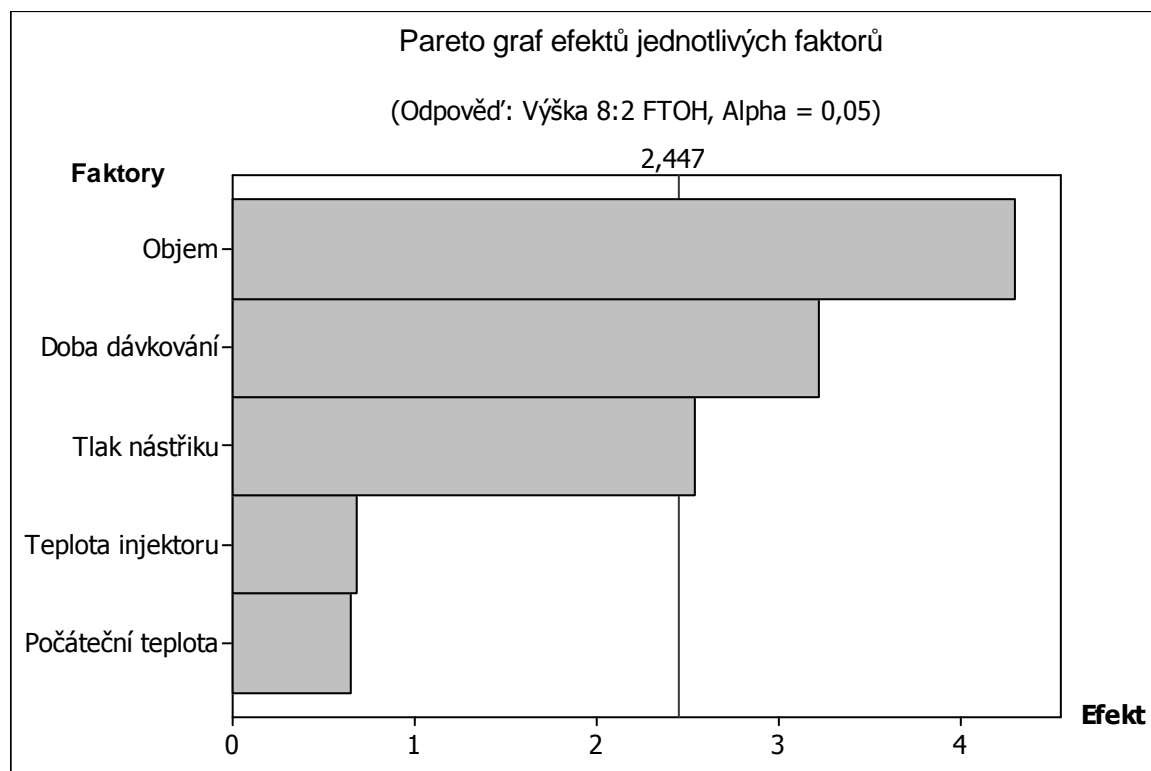
Po provedení série měření byly výsledky vyhodnoceny statistickým programem a parametry mající hlavní efekt byly určeny s 95 % pravděpodobností. Z důvodu větší přehlednosti a názornosti byly pro znázornění vlivů jednotlivých faktorů použity tzv. Pareto grafy (obr. 14 a 15), kde jsou na ose X uvedeny standardizované efekty a Y znázorňuje testované faktory bez vlivu vzájemných interakcí.



Obrázek 14 – Pareto graf pro 6:2 FTOH

Screeningová studie vybraných faktorů ukázala, že nejvýznamněji ovlivňuje výšku píku analytu objem vzorku, tlak nástřiku a počáteční teplota u kratšího z alkoholů, zatímco pro delší alkohol jsou to objem vzorku, čas dávkování a tlak nástřiku. Dále je patrné, že teplota injektoru nemá významný vliv ani u jednoho z analytů.

Po těchto zjištěních bylo dále v optimalizaci pokračováno se čtyřmi faktory (objem vzorku, tlak nástřiku, čas dávkování a počáteční teplota). Nevýznamný faktor – teplota injektoru byl nastaven na nižší hodnotu, 230 °C.



Obrázek 15 – Pareto graf pro 8:2 FTOH

4.2.4. Tvorba modelu pro GC metodu s EI – Box-Behnken design

V tomto kroku byl pro modelování a vyhodnocení experimentů použit Box-Behnken design, odpovídající plnému kvadratickému modelu se všemi druhy interakcí a rovnici v kapitole 2.4.2. Vybraným faktorům (objem vzorku, tlak nástřiku, počáteční teplota, doba dávkování), byly přiřazeny 3 hladiny (viz tabulka 4). Pro nízkou hodnotu je použito označení -1 , pro vysokou $+1$ a 0 odpovídá centrálnímu bodu.

Tabulka 4 – Testované faktory pro tvorbu modelu pro GC metodu s EI v Box-Behnken designu

Faktor		-1	0	+1
A	Objem vzorku (μL)	0,50	0,75	1,00
B	Tlak nástřiku (kPa)	50	100	150
C	Počáteční teplota ($^{\circ}\text{C}$)	42	46	50
D	Doba dávkování (min)	0,50	0,75	1,00

Tabulka 5 obsahuje seznam 27 měření, obsahující kombinace výše uvedených faktorů, vytvořených programem Minitab 16 za účelem tvorby polynomiálního modelu popisujícího daný systém.

Tabulka 5 - Série experimentů navržená programem Minitab 16 pro Box – Behnken design, pro tvorbu modelu pro GC metodu s elektronovou ionizací

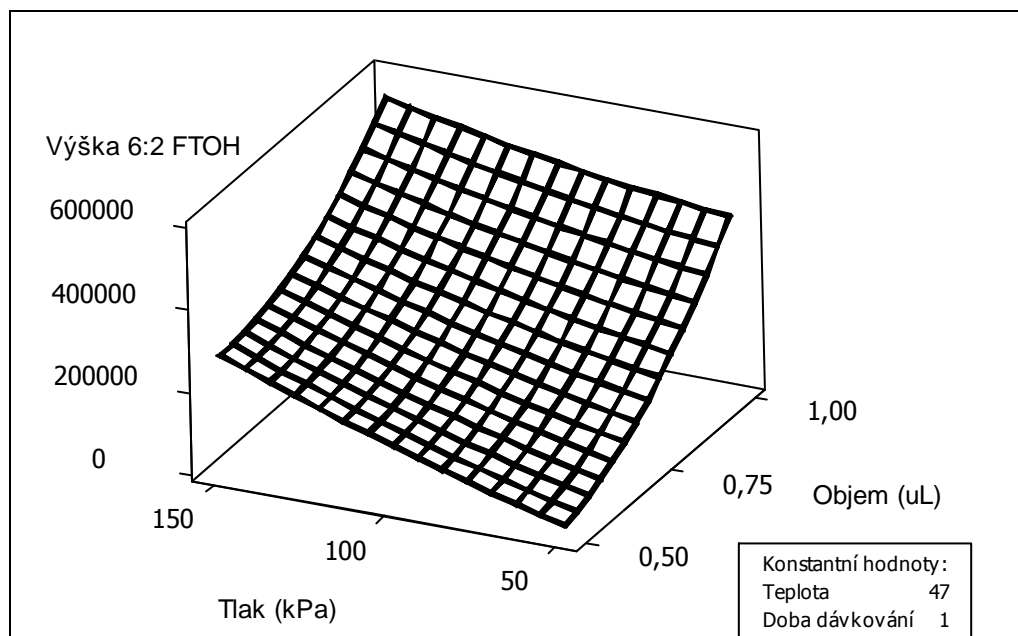
-	A	B	C	D
1	0	+1	0	+1
2	-1	0	0	+1
3	-1	0	-1	0
4	0	0	0	0
5	0	+1	0	-1
6	0	0	-1	+1
7	0	0	0	0
8	0	-1	-1	0
9	+1	0	0	+1
10	-1	-1	0	0
11	0	0	+1	-1
12	0	0	0	0
13	+1	-1	0	0
14	0	-1	0	+1
15	+1	+1	0	0
16	0	0	-1	-1
17	+1	0	+1	0
18	-1	0	0	-1
19	-1	+1	0	0
20	+1	0	-1	0
21	+1	0	0	-1
22	0	+1	-1	0
23	0	-1	0	-1
24	0	-1	+1	0
25	0	0	+1	+1
26	0	+1	+1	0
27	-1	0	+1	0

Statistickým vyhodnocením naměřených dat byly získány rovnice pro každou ze zkoumaných látek. Jednotlivé koeficienty, včetně koeficientu determinace R^2 , popisujícího shodu mezi naměřenými daty a modelem, jsou uvedeny v tabulce 6. Hodnoty R^2 ukazují, že model dobře vystihuje naměřená data.

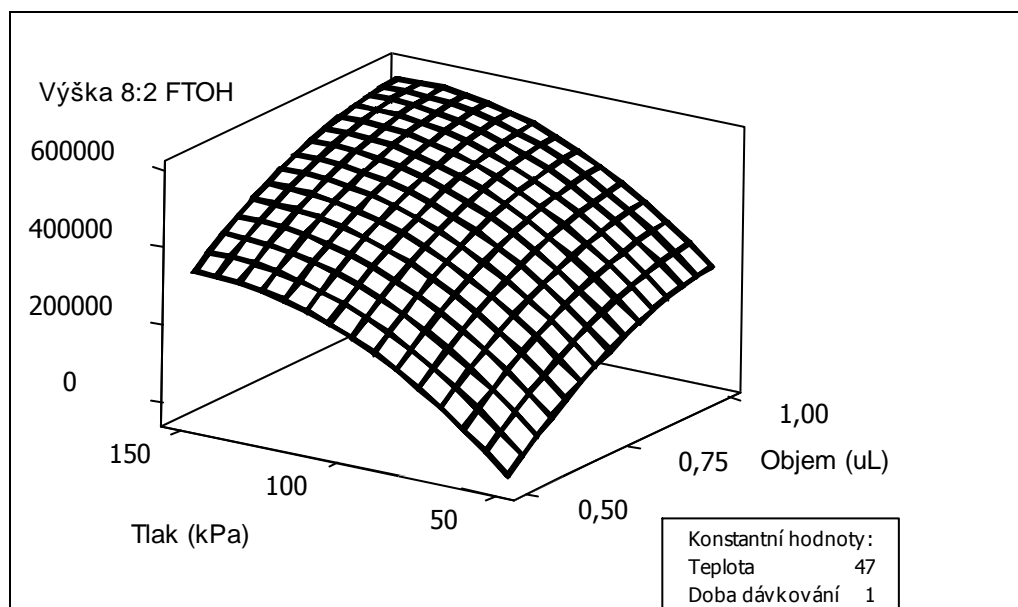
Tabulka 6 – Výsledné hodnoty regrese pro testované faktory

Faktor	6:2 FTOH	8:2 FTOH
β	8776722	-3142609
Objem vzorku ($V_{vz.}$)	-2846098	-3697047
Tlak nástřiku ($p_{nástřiku}$)	14722	-13197
Počáteční teplota ($t_{poč.}$)	-320105	217387
Doba dávkování ($t_{dáv.}$)	-1938046	822514
$V_{vz.} \cdot V_{vz.}$	1121387	-849175
$p_{nástřiku} \cdot p_{nástřiku}$	6	-37
$t_{poč.} \cdot t_{poč.}$	3275	-3842
$t_{dáv.} \cdot t_{dáv.}$	727979	-1335087
$V_{vz.} \cdot p_{nástřiku}$	-2509	-891
$V_{vz.} \cdot t_{poč.}$	32837	111756
$V_{vz.} \cdot t_{dáv.}$	538384	348284
$p_{nástřiku} \cdot t_{poč.}$	-344	411
$p_{nástřiku} \cdot t_{dáv.}$	4191	5316
$t_{poč.} \cdot t_{dáv.}$	5884	14925
R^2	0,884	0,839

Pomocí programu Minitab 16 bylo vytvořeno grafické znázornění modelu popsáno polynomicou rovnicí (viz obr. 16 a 17), přehledně demonstrující chování výšky píku analytu při změnách faktorů v rámci definovaných úrovní.



Obrázek 16 – Parciální 3D zobrazení závislosti výšky píku 6:2 FTOH na tlaku a objemu, při konstantní počáteční teplotě a době dávkování.



Obrázek 17 – Parciální 3D zobrazení závislosti výšky píku 8:2 FTOH na tlaku a objemu, při konstantní počáteční teplotě a době dávkování.

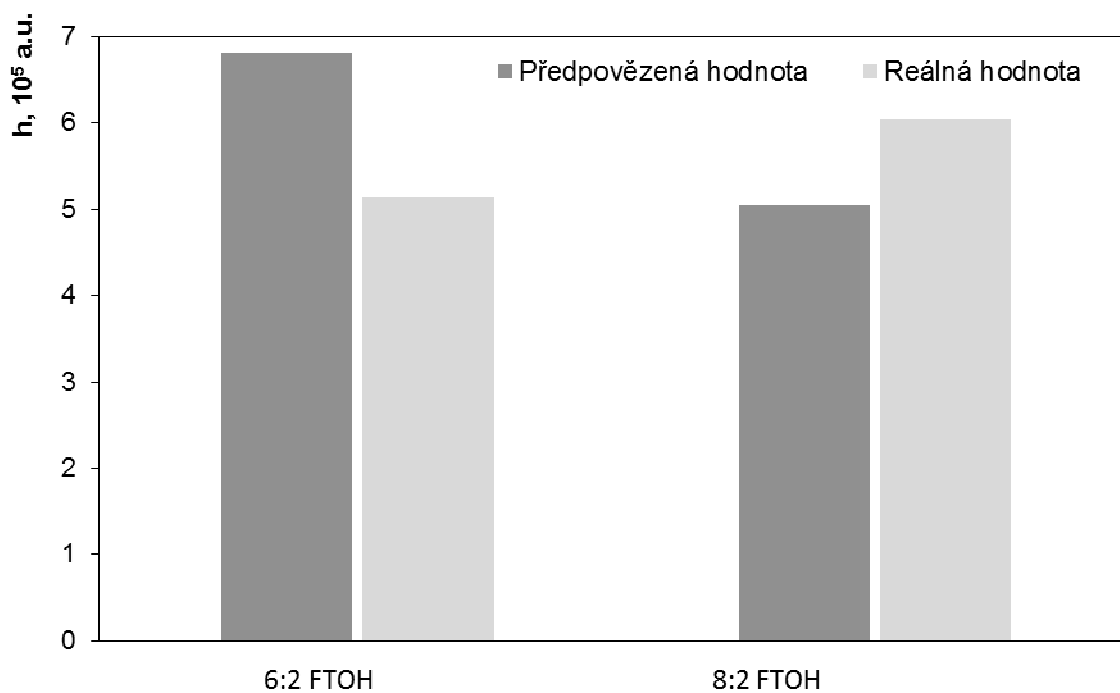
4.2.5. Nalezení optimálních hodnot

Posledním krokem celého postupu bylo nalezení optimálních hodnot pro zvolené faktory. Na základě informací o daném modelu byla zjištěna optima, nejprve pro každou látku zvlášť a poté pro obě současně. Cílem optimalizace bylo nastavení systému poskytujícího symetrické píky, při zachování maximální odezvy. Optimální hodnoty pro jednotlivé faktory byly získány pomocí statistického programu, pomocí hledání požadovaných extrémů ve vícerozměrném prostoru a nalezené hodnoty faktorů jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 – Optimální hodnoty získané optimalizací

-	$V_{\text{vzorku}} (\mu\text{L})$	$p_{\text{nástřiku}} (\text{kPa})$	$t_{\text{počáteční}} (^{\circ}\text{C})$	$t_{\text{dávkování}} (\text{min})$
6:2 FTOH	0,7	150	42	1
8:2 FTOH	1,0	150	50	1
oba	0,9	150	47	1

Rozdíly mezi předpovězeným chováním modelu a reálnými hodnotami získanými experimentálním měřením jsou zobrazeny na obrázku 18.

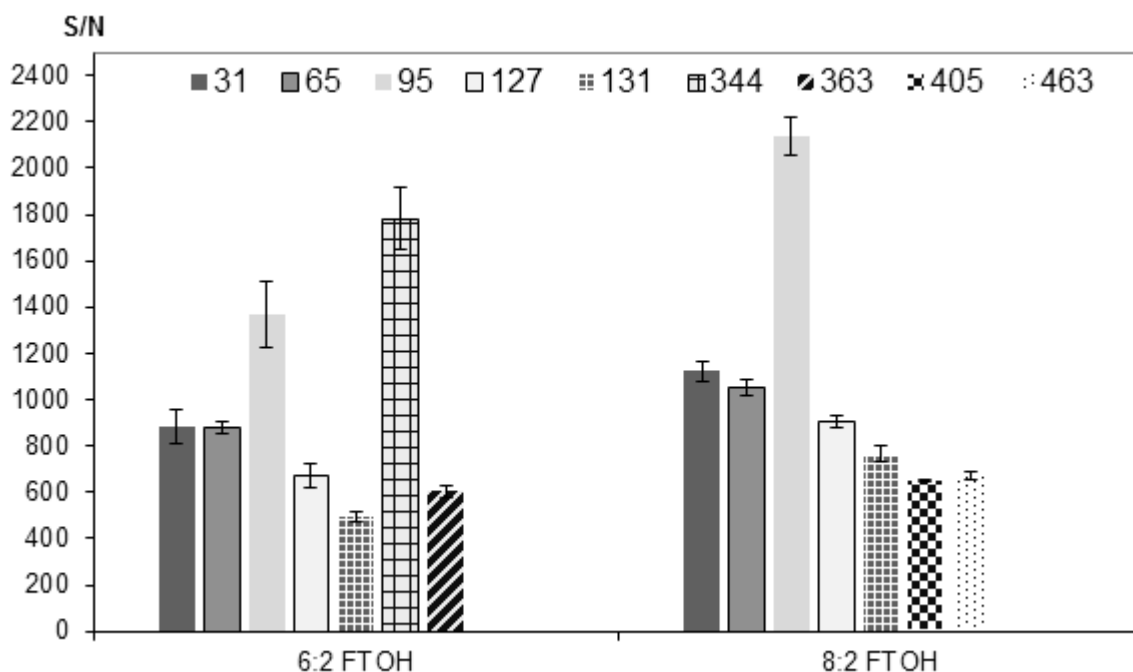


Obrázek 18 – Porovnání předpovězené a experimentálně zjištěné výšky pro oba analyty

4.2.6. Testování ionizací dle poměru S/N

Nastavení systému získané optimalizací bylo využito k testování všech typů ionizace (EI, NCI, PCI) podle poměru signál/šum, který je určujícím parametrem pro limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ). Limit detekce je určen koncentrací analytu s hodnotou poměru $S/N \geq 3$, pro LOQ platí poměr $S/N \geq 10$.

Testování bylo provedeno měřením 5 $\mu\text{g/mL}$ roztoku analytů v methanolu. Nadávkováno bylo 0,9 μL vzorku, nástřik byl proveden v módu splitless s využitím vysokotlakého nástřiku při hodnotě tlaku 150 kPa, detekce probíhala v režimu SIM, při sledování fragmentů m/z : 31, 65, 95, 127, 131, 344, 363, 405, 463.



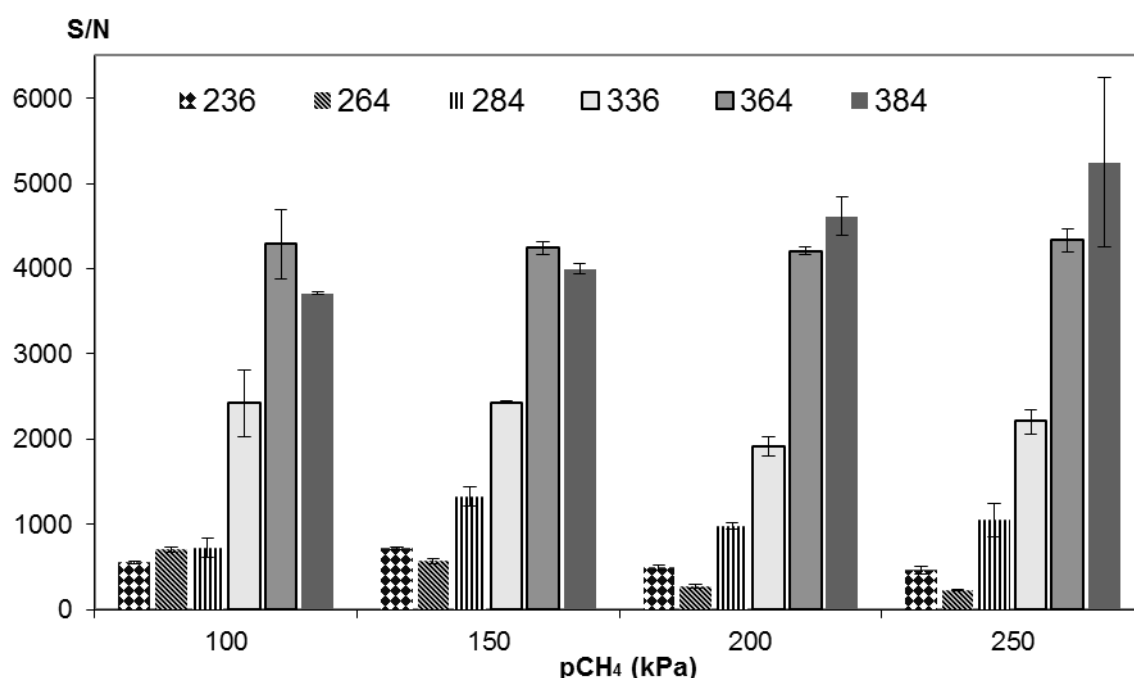
Obrázek 19 – Grafické zobrazení poměru S/N pro jednotlivé fragmenty obou analytů při použití elektronové ionizace

Hodnoty poměru signál/šum pro jednotlivé fragmenty jsou zobrazeny na obr. 19. Z grafického zobrazení je patrné, že nejvyšší poměr S/N a tudíž nejnížší hodnotu LOD pro 6:2 FTOH poskytuje fragment 344 (LOD = 8,4 ng/mL). Pro 8:2 FTOH je to fragment 95 ($\text{C}_3\text{F}_3\text{H}_2^+$) s LOD = 7 ng/mL. U 8:2 FTOH je také patrný snižující se poměr S/N, se zvyšující se hodnotou m/z fragmentu (s výjimkou 95).

Pro negativní chemickou ionizaci bylo provedeno testování roztoku o stejné koncentraci a tlaku nástřiku jako v předchozím případě, při sledování fragmentů o m/z : 236, 264, 284, 336, 364, 384.

Velikost odezvy analytů je při chemické ionizaci mimo jiné ovlivněna i tlakem reagenčního plynu. Z tohoto důvodu byla vytvořena závislost poměru S/N pro zvolené m/z fragmenty na tlaku reagenčního plynu (CH_4). Tlakový rozsah použitý při testování byl 100 – 250 kPa s krokem 50 kPa. Pro každý z nastavených tlaků byla provedena autokalibrace detektoru pomocí heptacosafuorotributylaminu, tzv. tuning.

Výsledky série měření byly zpracovány graficky (viz obr. 20). Fragmenty 236, 264 a 284 jsou charakteristické pro 6:2 FTOH a 336, 364, 384 pro 8:2 FTOH.



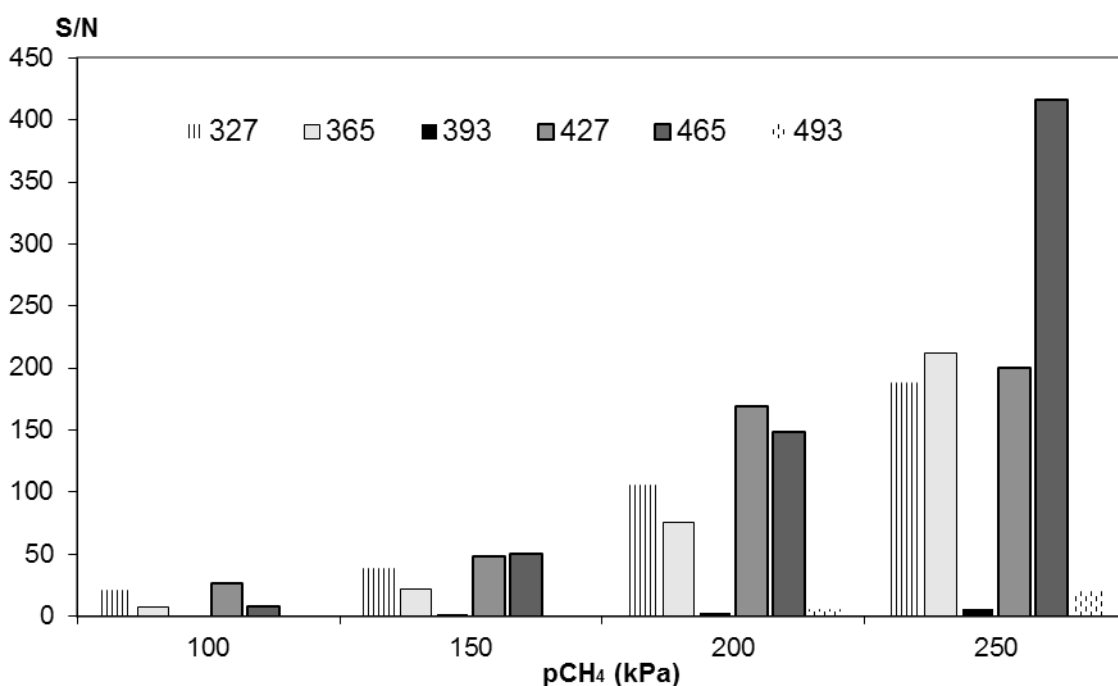
Obrázek 20 – Grafické zobrazení závislosti poměru S/N pro jednotlivé m/z na tlaku při NCI

Srovnáním bylo zjištěno, že optimální tlak pro detekci 6:2 FTOH je 150 kPa, při kterém poskytuje největší S/N fragment 284 a limit detekce při tomto nastavení je roven 5,3 ng/mL. Fragmenty charakteristické pro 8:2 FTOH poskytují ve zvoleném rozsahu tlaků téměř shodné hodnoty LOD (3,46 – 3,54 ng/mL pro 364 a 2,86 – 4,04 ng/mL pro 384), které jsou ovšem nižší, než v případě prvního alkoholu.

Vzhledem k malým odchylkám LOD u 8:2 FTOH při změnách tlaku je pro výběr optimálního tlaku pro oba analyty určujícím parametrem LOD prvního z alkoholů.

Posledním testovaným typem ionizace byla pozitivní chemická ionizace. Pro měření byl použit roztok analytů o koncentraci 5 $\mu\text{g/mL}$ za stejných podmínek, jako v předchozích případech.

Testovaný rozsah tlaků reagenčního plynu byl stejný jako v přechodím případě: 100 – 250 kPa s krokem 50 kPa. Zvolené fragmenty 327, 365 a 393 jsou specifické pro 6:2 FTOH, 427, 465 a 493 charakterizují druhý z analytů – 8:2 FTOH. Výsledná závislost poměrů S/N na tlaku reagenčního plynu byla zpracována graficky (viz obr. 21).



Obrázek 21 – Grafické zobrazení závislosti poměru S/N pro jednotlivé m/z na tlaku CH₄ při PCI

Na rozdíl od předchozího typu ionizace, je při použití PCI patrný jiný průběh závislosti S/N na tlaku methanu. Zatímco v předchozím případě se hodnoty S/N se změnou tlaku významně nelišily, při PCI s rostoucím tlakem CH₄ roste i poměr S/N. LOD pro oba alkoholy jsou výrazně vyšší (70 ng/mL pro 6:2 FTOH a 36 ng/mL pro 8:2 FTOH), než u obou předešlých ionizací.

Po otestování třech způsobů ionizace bylo srovnáním zjištěno, že nejlepší způsob ionizace pro stanovení fluorotelomerních alkoholů je podle výsledků negativní chemická ionizace, poskytující nejnižší limity detekce.

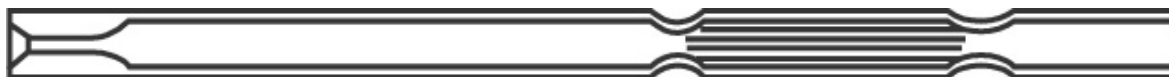
4.2.7. Testování různých typů linerů

V průběhu měření bylo testováno několik typů linerů. Prvním z testovaných byl univerzální skleněný Split/Splitless liner (viz obr. 22), o vnitřním objemu 670 μL .



Obrázek 22 – Split/Splitless liner - skleněný

Dalším z testovaných byl splitless focus liner (viz obr. 23) o vnitřním objemu 635 μL . V průběhu používání tohoto typu lineru se objevily problémy s kontaminací, pravděpodobně způsobenou zadržováním analytů uvnitř lineru. Efekt fokusace píků, pro který byl liner vybrán, nebyl prokázán a z výše uvedeného problému s kontaminací bylo rozhodnuto o jeho výměně.



Obrázek 23 – Splitless Focus Liner

Poslední testovaný byl univerzální kovový rovný liner s povrchem pokrytým oxidem křemičitým deaktivovaný silanizací a s vnitřním objemem 913 μL (viz obr. 24). Tento druh lineru měl největší kladný efekt na tvar píků analytů a velký nárůst vnitřního objemu oproti předchozím typům umožňuje zvětšení dávkovaného objemu vzorku.



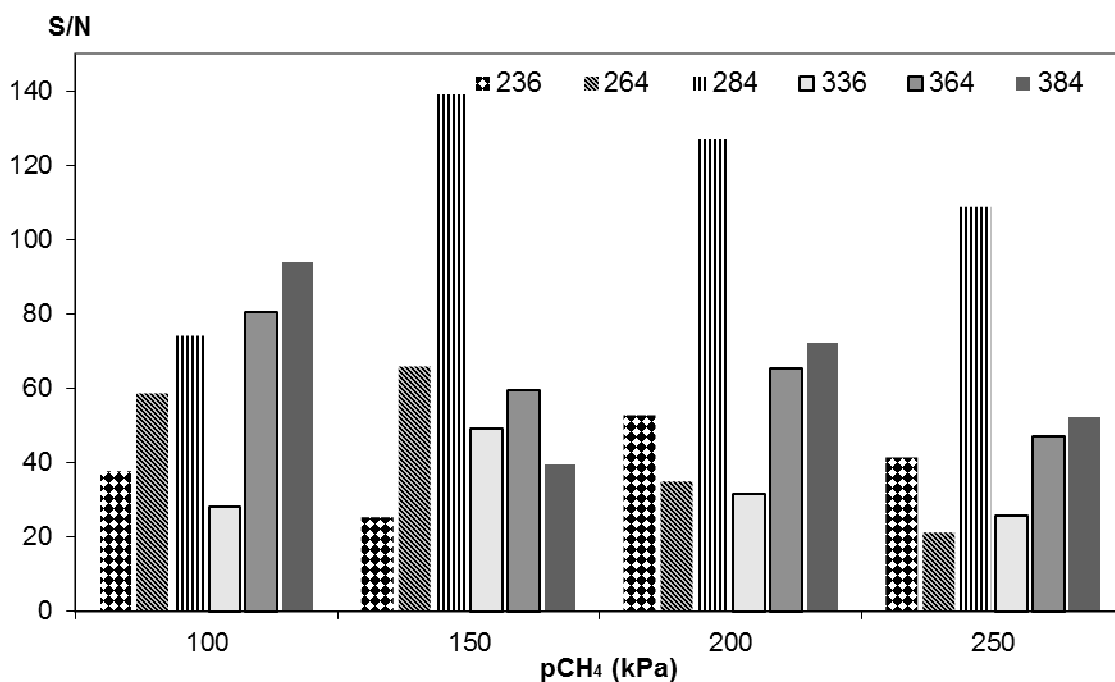
Obrázek 24 – Univerzální kovový liner

Po srovnání všech tří typů vybraných linerů byl na základě výsledků jako optimální zvolen poslední z testovaných.

4.2.8. Optimalizace tlaku methanu pro negativní chemickou ionizaci

Vzhledem k volbě lineru a možnosti zvýšit nástríkový objem bylo provedeno nové testování optimálního tlaku reagenčního plynu pro negativní chemickou ionizaci.

K měření byl použit roztok o koncentraci 10 ng/mL v methanolu, dávkovaný objem vzorku byl 2,5 μ L. Dávkování bylo provedeno ve splitless módu s využitím vysokotlakého nástríku při hodnotě tlaku 250 kPa a detektor byl nastaven v režimu SIM, při sledování fragmentů m/z: 236, 264, 284, 336, 364, 384. Testovaný tlakový rozsah byl 100 – 250 kPa s krokem 50 kPa. Sérií měření bylo dokázáno, že při zachování poměru objemu vzorku a tlaku nástríku určujícího objem par nadávkovaného vzorku a tím i zaplnění lineru nedojde při zvýšení objemu vzorku mimo testovaný rozsah (viz 4.2.4.) ke změně chování popsaného systému.



Obrázek 25 – Grafické zobrazení závislosti poměru S/N pro jednotlivé m/z na tlaku při NCI

Z grafické závislosti (viz obr. 25) je patrné, že nejvyšší poměr S/N poskytuje pro detekci 6:2 FTOH fragment 284 při hodnotě tlaku 150 kPa. Pro 8:2 FTOH je optimální hodnota tlaku 100 kPa a sledování fragmentu o m/z 384. Optimální hodnota tlaku reagenčního plynu pro stanovení obou alkoholů současně je 200 kPa, při kterém dochází ke kompromisu, ale se zachováním vysoké citlivosti. Limity detekce, určené pomocí přepočtu z poměru S/N, jsou: 0,24 ng/mL (6:2 FTOH) a 0,42 ng/mL (8:2 FTOH).

4.3. Optimalizace SPE

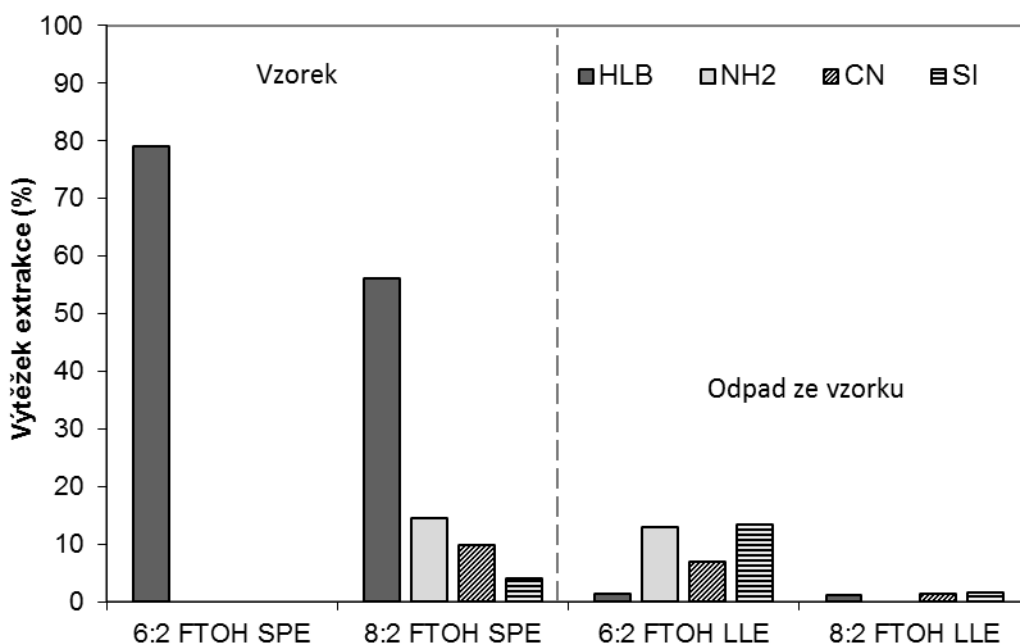
4.3.1. Výběr typu sorbentu pro SPE

Prvním krokem optimalizace byl výběr typu sorbentu pro SPE. K optimalizaci byly vybrány sorbenty typu: HLB (hydrofilně modifikovaný polystyrén), NH₂ (polymerně vázaný aminopropyl), CN (CN modifikovaný vysoce porézní syntetický silikagel) a Si (vysoce porézní syntetický silikagel).

Pro tato měření byly použity zásobní roztoky koncentraci 500 ng/mL a objemu 100 mL.

Roztoky byly připravovány před samotnou extrakcí a pro měření byla použita tříbodová kalibrační křivka s koncentračním rozsahem 0,5 – 50 µg/mL.

Předúprava kolon byla provedena dle doporučení výrobce, kdy eluce byla ve všech případech provedena methanolem. Pro zjištění zachytu testovaných analytů (6:2 FTOH a 8:2 FTOH) na sorbentu byl testován eluát i odpadní roztok prošlý extrakční kolonkou. Testování odpadního roztoku bylo provedeno extrakcí MTBE popsanou v kapitole 3.3.5. Zjištěný obsah analytů zachycených sorbentem i koncentrace v odpadním roztoku byl vyhodnocen pomocí kalibrační křivky a vyneseno do grafu jako výtěžek extrakce (viz obr. 26). Po provedení testovacích extrakcí a vyhodnocení výsledků byl jako nejvhodnější zvolen sorbent typu HLB.



Obrázek 26 – Grafické porovnání účinnosti extrakce pro jednotlivé typy SPE sorbentů a analýzy obsahu analytů v odpadních roztocích

Rozdíl mezi teoretickou účinností extrakce (100 %) a součtem množství analytů zjištěných pomocí SPE a LLE je způsoben použitím neoptimalizovaného postupu extrakcí, ztrátami při zakoncentrování vzorků a použitím jiného rozpouštědla (MTBE) u LLE, než pro jaké byla nastavena GC metoda a změřena kalibrační křivka.

4.3.2. Screening pro HLB

K určení faktorů ovlivňující účinnost extrakce byl využit 1/16 frakční faktoriál design. Všem vybraným faktorům (viz tabulka 8) byly přiřazeny 2 kódované úrovně.

Tabulka 8 – Zvolené parametry pro Plackett-Burman desing

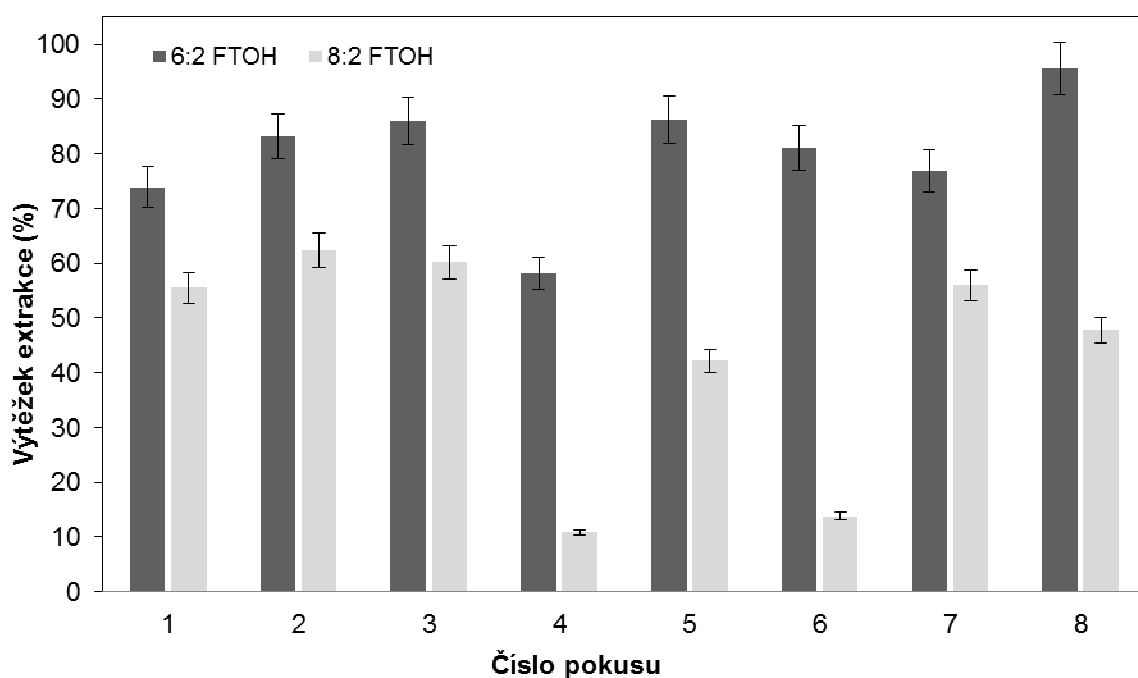
	Faktor	(-)	(+)
A	Kondicionační činidlo	MeOH	ACN
B	Objem činidla (mL)	1,5	3,0
C	Rychlost kondicionace	samovolně	podtlak
D	Rychlost průtoku vzorku (mL/min)	5	15
E	Sušení kolony	vzduch	N ₂
F	Eluční činidlo	MeOH	ACN
G	Eluční objem (mL)	1,5	3,0

S využitím statistického programu Minitab 16 a zvolených faktorů byla vytvořena kódovaná tabulka (viz tabulka 9), sloužící jako seznam experimentů nutných pro provedení screeningu. Pro screeningová měření byly použity roztoky o objemu 100 mL a koncentraci 100 ng/mL, vyhodnocování účinnosti extrakce bylo prováděno přepočtem pomocí kalibrační křivky s koncentračním rozsahem 1 – 25 µg/mL.

Tabulka 9 – Série pokusů navržená programem Minitab 16 pro Plackett-Burman design

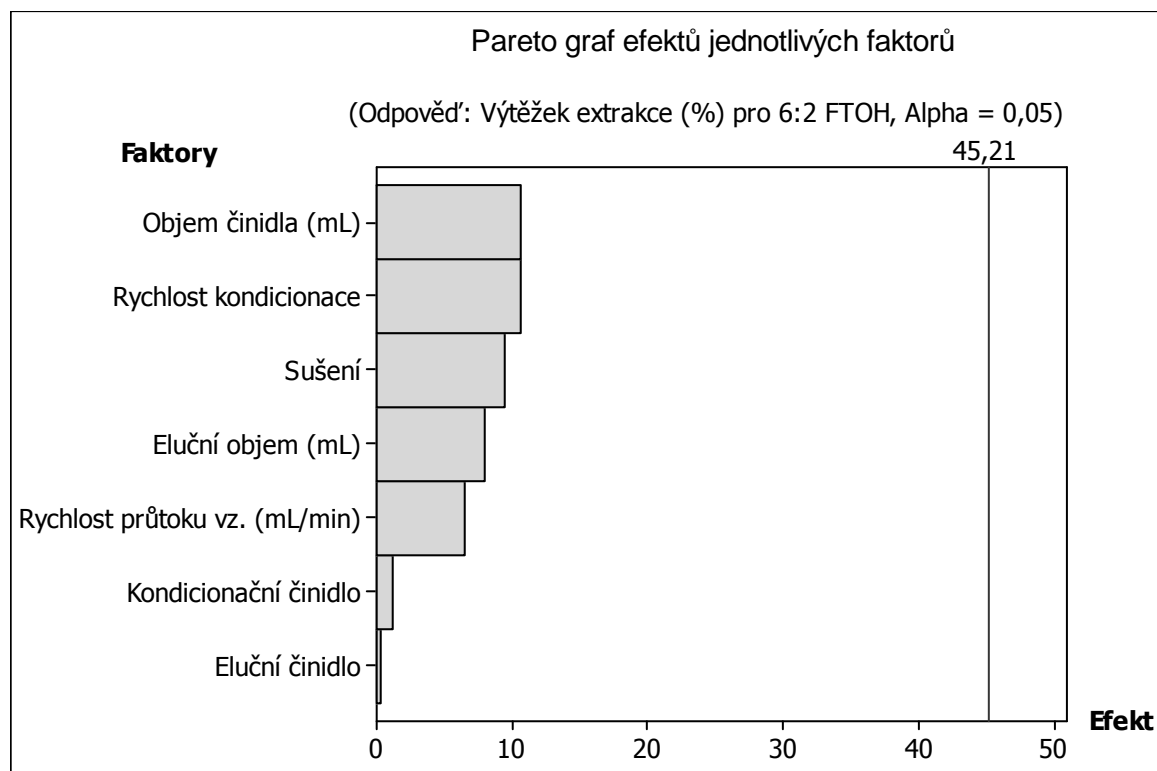
	A	B	C	D	E	F	G
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	-	-	-	-	+	+
4	+	-	+	-	+	-	-
5	-	+	-	-	+	-	+
6	-	-	+	+	-	-	+
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	-	+	-	-	-

Vyhodnocení jednotlivých experimentů bylo provedeno pro oba alkoholy zvlášť pomocí účinnosti extrakce (viz obr. 27). Výtěžek extrakce v procentech byl spočítán z množství hledaných analytů určených z plochy píku a kalibrační závislosti vztaženého k množství analytu v roztoku kalibrační řady o odpovídající koncentraci, počítaném z koncentrace standardu v daném roztoku a prekoncentračního faktoru. Prekoncentrační faktor je roven podílu výchozího objemu roztoku ke konečnému objemu roztoku, použitým k analýze na GC.

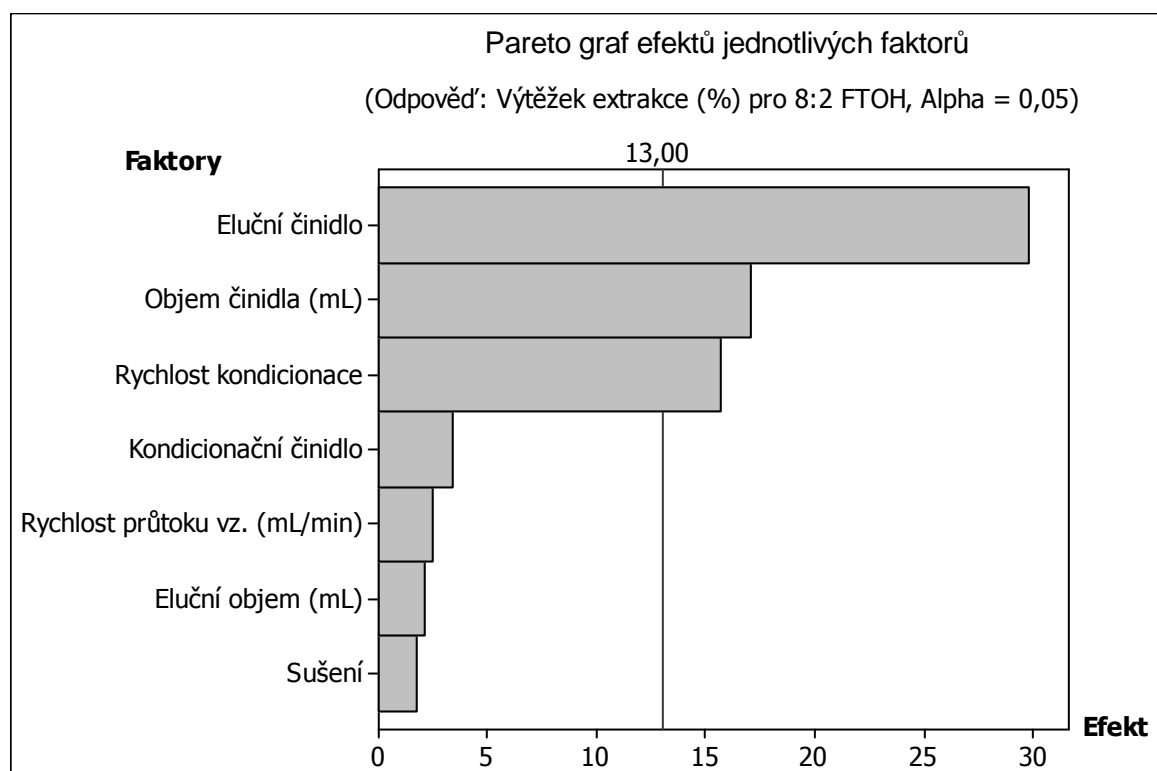


Obrázek 27 – Závislost výtěžku extrakce na kombinacích testovaných faktorů při screeningu SPE

Z výsledků získaných změřením navržené série experimentů byly pomocí statistického programu určeny s 95 % pravděpodobností faktory, mající hlavní vlivy na průběh a účinnosti extrakce. Pro znázornění efektů jednotlivých faktorů byly využity Pareto grafy (obr. 28 a 29), kde jsou na ose X uvedeny standardizované efekty a Y znázorňuje testované faktory bez vlivu vzájemných interakcí. Z těchto grafů je patrné, že ani jeden ze zvolených faktorů nemá vliv na účinnost extrakce prvního alkoholu (6:2 FTOH), zatímco v případě 8:2 FTOH dochází k ovlivnění pomocí druhu elučního činidla, objemu kondicionačního činidla a rychlosti kondicionace. Ostatní faktory (druh kondicionačního činidla, rychlost průtoku vzorku kolonou, eluční objem a způsob sušení) byly shledány jako statisticky nevýznamné.



Obrázek 28 – Pareto graf pro screening faktorů SPE prekoncentrace u 6:2 FTOH



Obrázek 29 – Pareto graf pro screening faktorů SPE prekoncentrace u 8:2 FTOH

4.3.3. Optimální hodnoty pro SPE

Vzhledem k výsledkům získaným při screeningové studii bylo rozhodnuto vynechat optimalizační krok modelování z následujících důvodů: druhem elučního činidla, tj. faktorem majícím největší vliv, byl na základě lepších výsledků při analýze a problémům s MeOH (viz kapitola 4.4.1.) zvolen ACN. Tato změna rozpouštědla navíc umožnila zvýšení nástřikového objemu na 3 μ L. Další z faktorů, rychlost kondicionace, byl z důvodu jednoduchosti zvolen na samovolně. Poslední faktor, objem kondicionačního činidla, byl spolu s ostatními faktory nemajícími vliv zvolen pomocí programu.

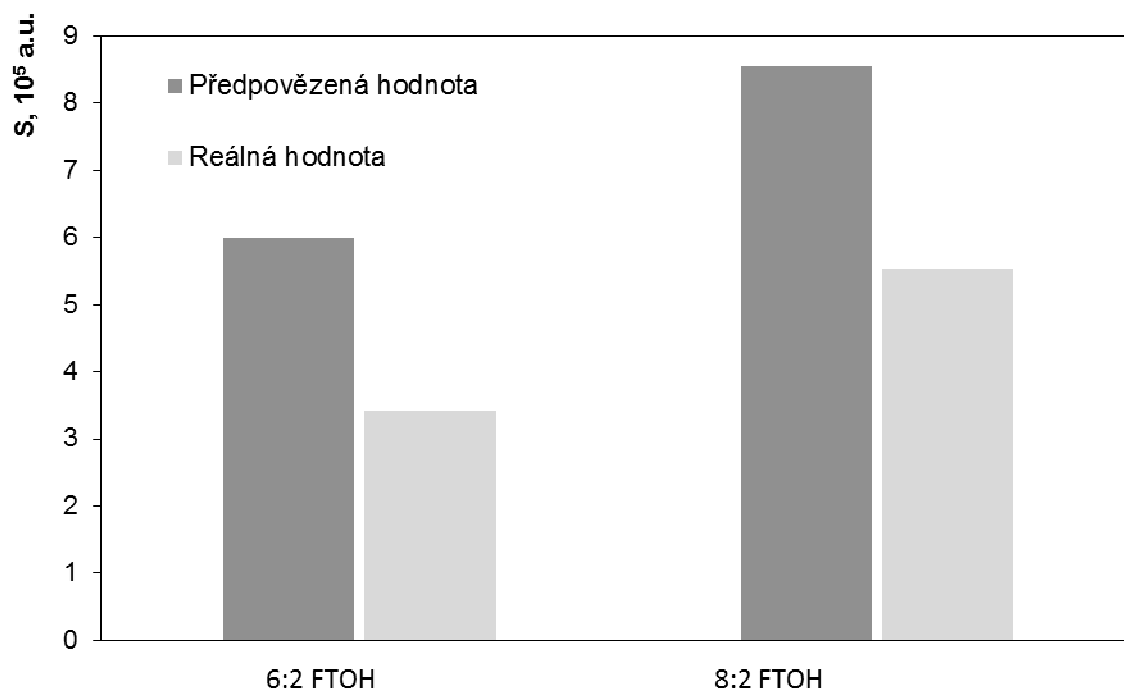
I přes vynechání designu pro tvorbu polynomicke rovnice je možno určit optimální hodnoty faktorů, které jsou však určovány pouze ze dvou zadaných úrovní, výsledků získaných screeningem a jsou obvykle experimentálně ověřeny.

Optimální hodnoty úrovní pro jednotlivé faktory pro každý z analytů a pro obě látky společně jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10 – Optimální hodnoty pro SPE získané optimalizací

Faktor	6:2 FTOH	8:2 FTOH	oba
Kondicionační činidlo	MeOH	ACN	ACN
Objem činidla (mL)	3,0	3,0	3,0
Rychlost kondicionace	samovolně	samovolně	samovolně
Rychlost průtoku vzorku (mL/min)	15	15	15
Sušení kolony	N ₂	N ₂	N ₂
Eluční činidlo	MeOH	ACN	ACN
Eluční objem (mL)	3,0	3,0	3,0

Grafické srovnání předpovězené a experimentálně zjištěné účinnosti, vyjádřené plochou píků jednotlivých analytů (viz obr. 30), demonstruje menší přesnost odhadů při vynechání kroku modelování.



Obrázek 30 – Porovnání předpovězené a reálně naměřené hodnoty plochy píku pro oba alkoholy

4.3.4. Konečné úpravy extraktu

Přídavek stabilizačního rozpouštědla

Další možností, jak vyměnit extrakční rozpouštědlo bez odpaření roztoku a snížit objem extraktu, je přídavek mísitelného rozpouštědla s vyšším bodem varu – stabilizačního rozpouštědla. Při zakoncentrování dojde k odpaření těkavějšího rozpouštědla a získaný koncentrát ve stabilizačním rozpouštědle o menším objemu je možno dále zpracovávat. Jako stabilizační rozpouštědla byly použity: propanol, butanol, cyklohexanon, hexanol, oktanol a nonanol. V průběhu testování bylo zjištěno, že žádné z výše uvedených rozpouštědel nelze využít z důvodu koelucí se sledovanými analyty. Poslední z testovaných, nonanol, nekoeluoval s žádným z analytů, ale z důvodu jeho vysoké teploty varu (214 °C) a viskózní povaze docházelo k jeho částečnému zadržení v částech injektoru i kolony a tím také k následné kontaminaci následujících vzorků.

Zakoncentrování

Z důvodu nemožnosti odpařit roztok s analyty do sucha a vzniklý odparek rozpustit v požadovaném objemu rozpouštědla (stejného či jiného) nebo využití přídavku stabilizačního rozpouštědla, byl získaný eluát zakoncentrováván odpařováním na zvolený objem v kalibrovaných vialkách. Testováno bylo zakoncentrovávání proudem vzduchu a dusíku, za tepla (50 °C) i laboratorní teploty. Na základě těchto testů bylo jako optimální

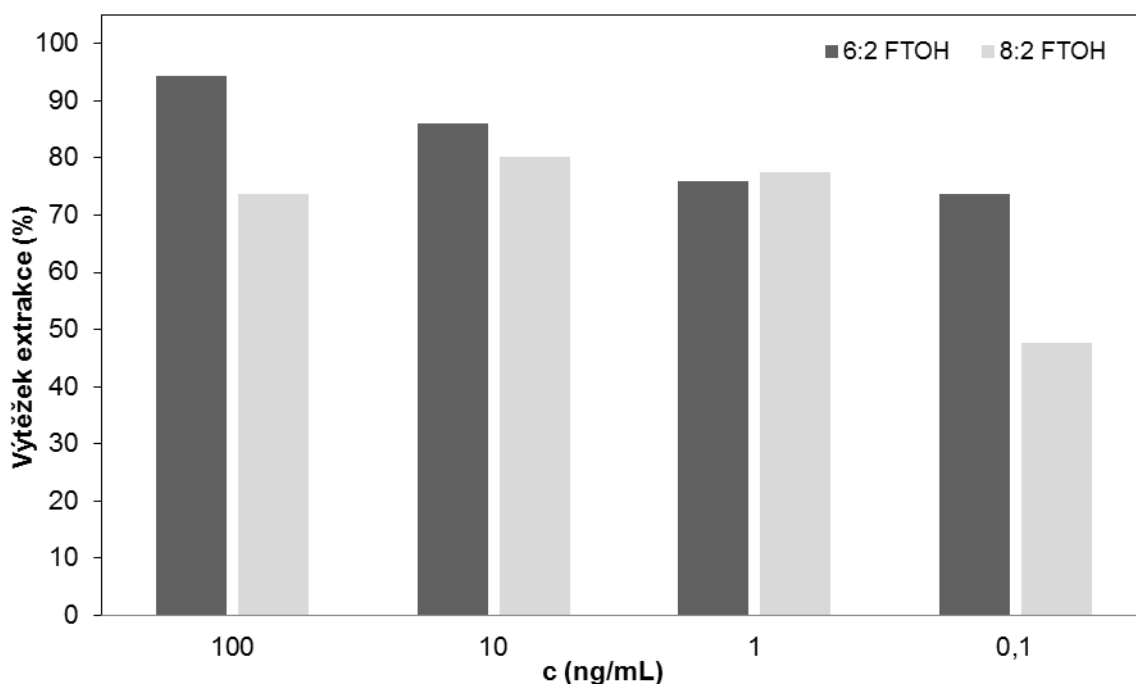
možnost zvoleno použití proudu dusíku při laboratorní teplotě. Ztráty při tomto kroku byly experimentálně určeny v intervalu 5 – 12 % u obou analytů.

K testování použitelnosti SPE metody byla připravena série zásobních roztoků o objemu 500 mL s koncentrací standardů 5 pg/mL, 10 pg/mL a 20 pg/mL. Měření bylo prováděno v dubletech. Extrakce byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.4. s úpravou finálního objemu na 0,5 mL. Vzorek byl měřen postupem popsáním v kapitole 3.3.6. Ani v jednom z modelových vzorků nebyla potvrzena přítomnost 6:2 a 8:2 FTOH. Na základě těchto neúspěšných experimentů bylo provedeno měření závislosti výtěžku extrakce na koncentraci analytů ve vzorku a objemu vzorku.

4.3.5. Závislost výtěžku extrakce na koncentraci analytů v roztoku

Pro zjištění vlivu koncentrace analytů v zásobním roztoku na účinnost extrakce byla připravena série čtyř zásobních roztoků o objemu 100 mL s koncentrací analytů: 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL a 0,1 ng/mL.

SPE extrakce byla provedena podle postupu 3.3.4., po extrakci následovala GC – MS analýza dle postupu 3.3.6. a výsledky analýz byly vyneseny do grafu. Výtěžek extrakce v procentech byl spočítán z množství hledaných analytů, určených plochou píku a kalibrační závislosti, vztaženého k roztoku kalibrační řady o odpovídající koncentraci, počítané z koncentrace standardu v daném roztoku a prekoncentračního faktoru. Uvedený výpočetní vztah bude použit i v následujícím experimentu.

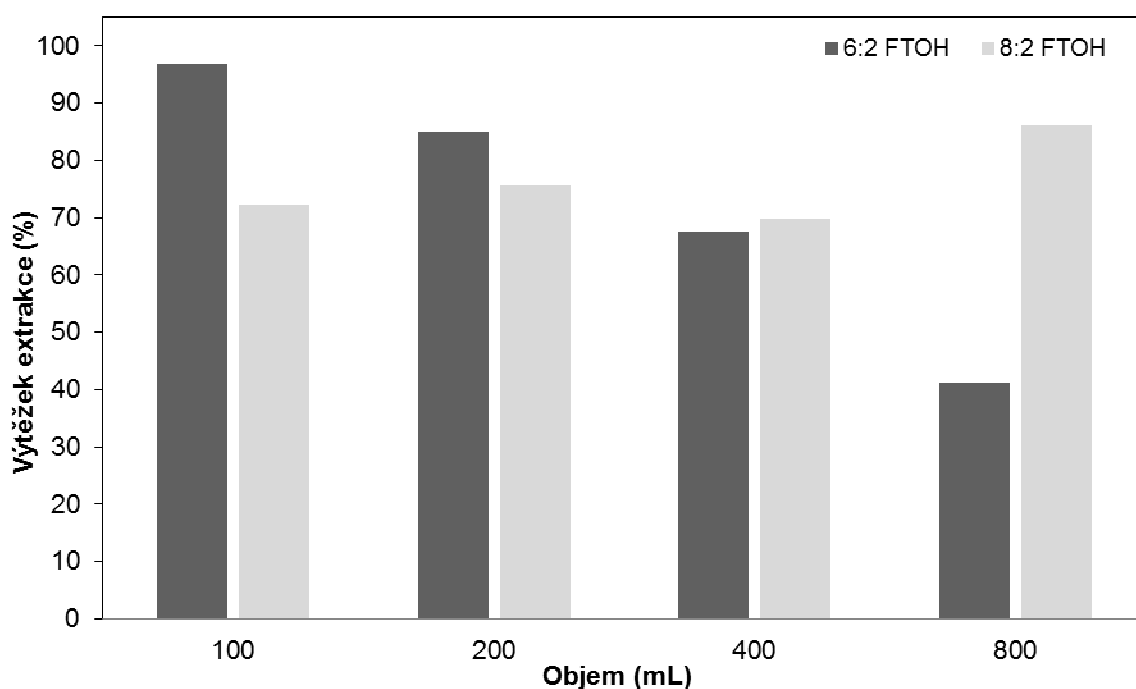


Obrázek 31 – Graf závislosti výtěžku extrakce na koncentraci zásobního roztoku

Grafické vyjádření (obr. 31) znázorňuje klesající tendenci výtěžku extrakce při snižování koncentrace zásobního roztoku. Zatímco u 6:2 FTOH je patrný postupný pokles účinnosti a rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou je okolo 20 %, u druhého analytu 8:2 FTOH je v prvních třech případech účinnost téměř stejná a k výraznému poklesu (30 %) dojde u nejméně koncentrovaného roztoku (0,1 ng/mL).

4.3.6. Závislost výtěžku extrakce na objemu vzorku

Dalším faktorem ovlivňujícím výtěžek extrakce může být objem vzorku. Pro ověření tohoto tvrzení byla připravena série čtyř zásobních roztoků o objemech 100, 200, 400 a 800 mL, s výchozí koncentrací roztoků (10, 5, 2,5 a 1,25 ng/mL) a stejnou výslednou teoretickou koncentrací analytů (1,25 µg/mL) vypočtenou pomocí výchozích koncentrací a prekoncentračních faktorů (125, 250, 500, 1000). Postup extrakce, analýza a výpočet výtěžku extrakce byl proveden dle stejného postupu jako v kapitole 4.3.5.



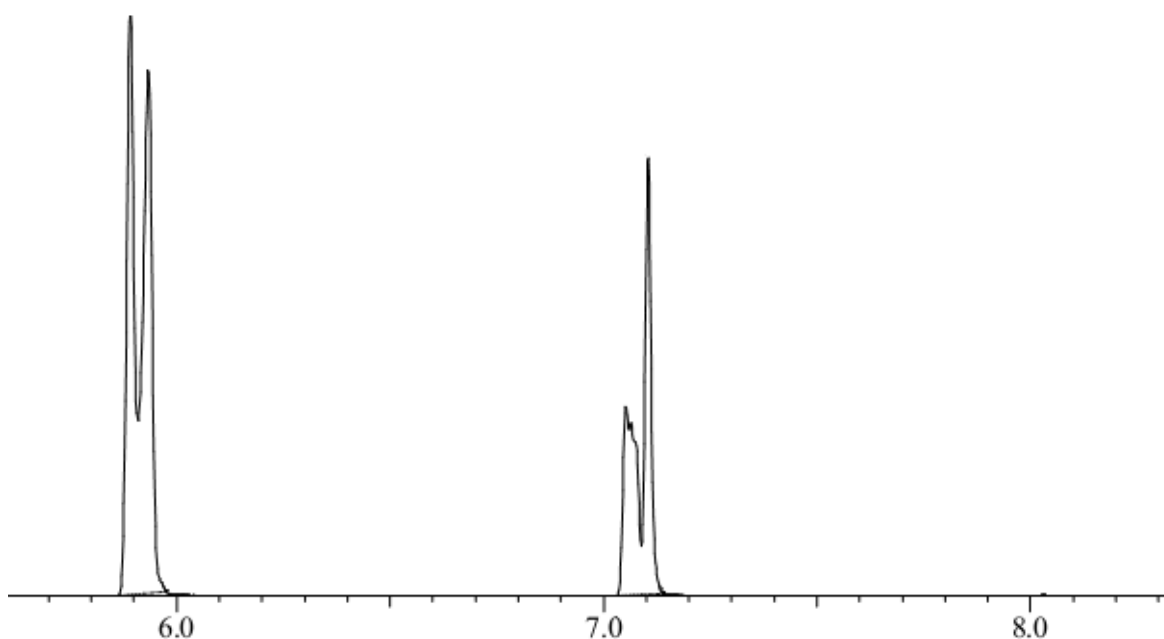
Obrázek 32 – Graf závislosti výtěžku extrakce na objemu zásobního roztoku

Z grafického vyjádření (obr. 32) je patrné, že se vzrůstajícím objemem dochází k výraznému poklesu výtěžku extrakce u prvního alkoholu z 90 % (100 mL) na téměř 40 % (800 mL). Podobně jako v předchozím případě, dochází u druhého alkoholu (8:2 FTOH) pouze k drobným změnám v hodnotě výtěžku, výjimku tvoří poslední zásobní roztok o největším objemu, kde dochází k nárůstu výtěžku extrakce.

4.4. Problémy při analýze a jejich řešení

4.4.1. Štěpení píků při použití methanolu

V průběhu optimalizace SPE extrakce došlo v několika případech ke štěpení píků analytů (viz obr. 33). Screeningové měření bylo doměřeno, vyhodnocování takto poškozených píků bylo prováděno integrací pouze symetrické části píku. Vzhledem k množství kombinací faktorů použitých při měření byla detekce příčin problému značně složitá. Diskutovanými důvody byly: oxidace fluorotelomerních alkoholů na aldehydy v průběhu extrakce, vliv nečistot obsažených ve standardech a vliv použitého rozpouštědla. Oxidace na aldehyd nebyla experimentálně potvrzena. Obsah nečistot ve standardech byl testován pomocí analýzy na GC-ECD, GC-FID a GCxGC-FID, ani v jednom případě nebyl zjištěn výskyt nečistot způsobujících výše zmíněný problém. Důvod deformace a štěpení píků analytů byl pravděpodobně způsoben nevhodnou volbou polaroty rozpouštědla vzhledem k polaritě stacionární fáze a aktuálním nastavením systému.

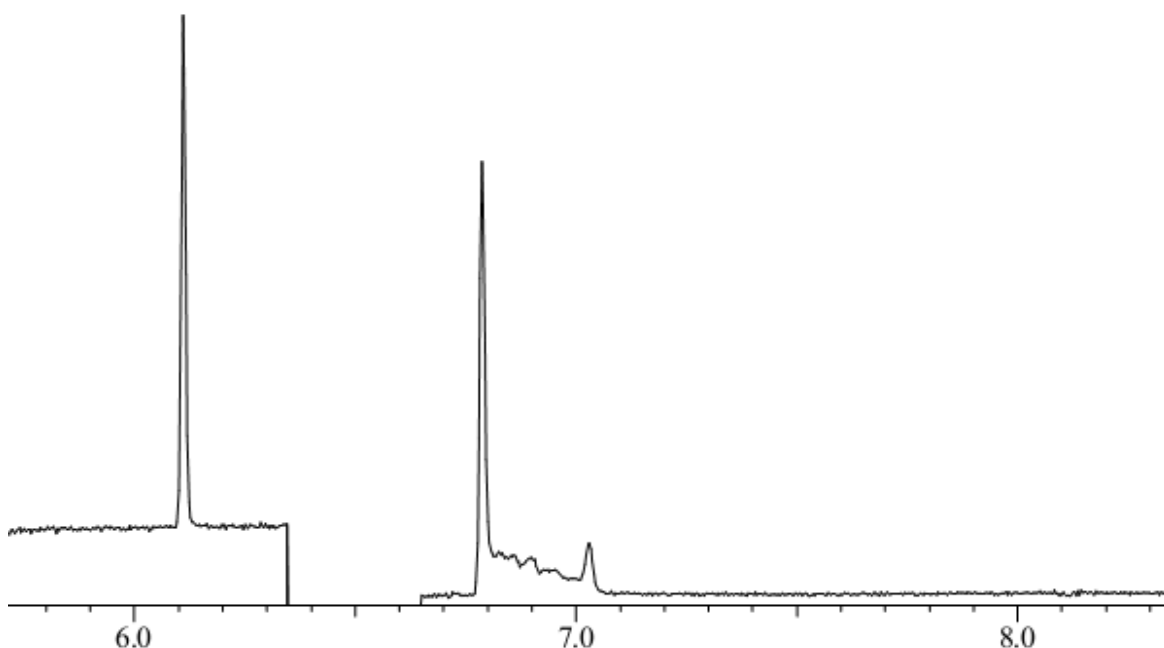


Obrázek 33 – Deformace píků analytů v průběhu optimalizaci SPE při použití MeOH

4.4.2. Deformace píků při použití acetonitrilu

Po úspěšné optimalizaci SPE při použití acetonitrilu se v průběhu následných měření objevil problém s deformací píku druhého analytu (8:2 FTOH). Na rozdíl od předchozího případu, kdy docházelo k deformacím obou píků, v tomto případě byl pík prvního alkoholu

bez jakékoliv deformace (viz obr. 34). Roztažení druhého píku bylo pozorováno nezávisle na typu použité ionizace. I přes tento jev byla měření reprodukovatelná.



Obrázek 34 – Deformace píku 8:2 FTOH při měření s ACN

Tento problém je pravděpodobně výsledkem společného působení několika jevů. První příčinou může být nekompatibilita polaritý stacionární fáze s používaným rozpouštědlem (ACN), kdy rozpouštědlo nesmáčí povrch stacionární fáze kolony. Dalším faktorem je pak použití vysokotlakého nástřiku a velký nástřikový objem.

4.4.3. Návrhy možných řešení problémů

1. Zředění rozpouštědla polárnějším

Efekt zvýšení polaritý acetonitrilu byl testován pomocí přídatku acetonu v prvním a tetrahydrofuranu v druhém případě. Takto připravená směs rozpouštědel (1:1) a FTOH byla měřena za stejných podmínek jako vzorky acetonitrilu. Ani v jednom případě nepřinesl přídatek polárnější látky požadované zlepšení.

2. Zmenšení nástřikového objemu vzorku a tlaku

Vliv dávkovaného objemu a nástřikového tlaku byl testován pomocí série měření s různým nastavením těchto veličin. Na základě těchto experimentů bylo zjištěno, že vypnutím módu vysokotlakého nástřiku dochází k výraznému zlepšení situace, ale z důvodu závislosti nástřikového objemu vzorku na tomto tlaku nelze dané řešení

považovat za použitelné, kvůli výraznému snížení citlivosti vlivem redukce dávkovaného objemu z 3 na 1,3 μL .

3. Výměna rozpouštědla

Vzhledem k výsledkům prvního kroku bylo rozhodnuto vyzkoušet nepolární rozpouštědla pro ověření funkčnosti metody. Testovanými rozpouštědly byly hexan, MTBE a CCl_4 , všechny roztoky měly koncentraci 10 $\mu\text{g/mL}$ FTOHs. Při použití MTBE došlo k výraznému zlepšení, problém se štěpením druhého píku byl zcela odstraněn, píky byly ostré a symetrické. Použití hexanu přineslo horší výsledky než v předchozím případě a s CCl_4 nedošlo ke zlepšení.

Výsledek analýzy s MTBE potvrdil funkčnost metody a pravděpodobnou příčinu deformace druhého píku, špatnou smáčivost stacionární fáze kolony při zvolené kombinaci objem nástřiku - tlak nástřiku - zvolené rozpouštědlo.

Nesmáčivost stacionární fáze rozpouštědlem je problém známý a v literatuře popsáný, ale vzhledem k bezproblémové funkčnosti metody při počátečních měřeních a vzniku komplikací až v průběhu měření byla detekce právě tohoto problému značně komplikovaná a časově náročná.

Efekt rozštěpení píku je pravděpodobně způsoben rozpadem zóny rozpouštědla s obsahem analytů po nástřiku. Jelikož se rozpouštědlo nesorbuje ve stacionární fázi, pohybuje se jeho zóna kolonou po povrchu stacionární fáze vlivem proudu nosného plynu. Na začátku kolony dojde k rozrušení a rozpadu této zóny a jednotlivé části zóny se mohou pohybovat rozdílnými rychlostmi v závislosti na své velikosti a tvaru. Analyty obsažené v těchto oddělených částech zóny rozpouštědla se odpařují a jsou unášeny kolonou různými rychlostmi k detektoru a výsledný pík v chromatogramu je vlivem tohoto efektu tvořen spojitým součtem série píků.

4. Výměna kolony

Efekt výměny středně polární kolony RTX-200 MS za polárnější nebyl vyzkoušen z časových a technických důvodů.

5. Shrnutí

V první části práce byla optimalizována GC metoda. Po výběru způsobu ionizace byl pro vybrané faktory (objem nástřiku, tlak nástřiku, počáteční teplota kolony, čas dávkování vzorku a teplota injektoru) zjišťován jejich vliv na odezvu. Pro faktory, vyhodnocené jako významné, bylo provedeno modelování a na základě tohoto modelu předpovězeny optimální hodnoty. Na základě této predikce a korekce pomocí experimentálních měření bylo určeno toto optimální nastavení faktorů pro analýzu fluorotelomerních alkoholů: objem nástřiku 3,0 μL , tlak nástřiku 250 kPa, počáteční teplota kolony 46,5 $^{\circ}\text{C}$, čas dávkování 1 minuta a teplota injektoru 230 $^{\circ}\text{C}$. Použita byla negativní chemická ionizace a tlak reagenčního plynu byl nastaven na 200 kPa. Instrumentální limity detekce, pro tuto metodu získané na základě poměru S/N jsou 0,24 ng/mL pro 6:2 FTOH a 0,42 ng/mL pro 8:2 FTOH.

Další část práce byla zaměřena na optimalizaci SPE, zahrnující výběr typu sorbentu, určení faktorů ovlivňující proces SPE a optimalizace této extrakce. Na základě výsledků analýz byl zvolen sorbent typu HLB a vybrány tyto faktory: druh kondicionačního činidla, objem činidla, rychlost kondicionace, rychlost průtoku vzorku, způsob sušení kolony, druh elučního činidla a objem elučního činidla. Po vyhodnocení screeningové studie bylo zjištěno, že žádný z faktorů nemá statisticky významný vliv na průběh extrakce 6:2 FTOH. Z tohoto důvodu bylo nastavení jednotlivých faktorů přizpůsobeno pro získání maximálního výtěžku u 8:2 FTOH. Za dodržení výše uvedených podmínek byly otestovány roztoky alkoholů o objemu 500 mL a koncentracích 5, 10 a 20 pg/mL. Z důvodu neuspokojivých výsledků analýz těchto roztoků byla testována závislost výtěžku extrakce na koncentraci a objemu zásobního roztoku analytů.

Testováním závislosti výtěžku extrakce na koncentraci zásobního roztoku byl zjištěn postupný mírný pokles výtěžku extrakce u prvního analytu při snižování koncentrace zásobního roztoku, v případě druhého analytu byl výtěžek téměř neměnný a ke skokovému snížení o asi 30 % došlo u nejméně koncentrovaného roztoku.

Sledováním závislosti výtěžku extrakce na objemu zásobního roztoku vzorku při zachování konstantního látkového množství analytů bylo zjištěno, že zvětšování objemu výrazně ovlivňovalo výtěžek extrakce 6:2 FTOH, u kterého docházelo k výraznému snížení asi o 50 %, zatímco u 8:2 FTOH nedocházelo k výrazným změnám s výjimkou posledního roztoku s největším objemem, kdy došlo k drobnému nárůstu výtěžku.

6. Závěr

Pomocí vícerozměrných optimalizačních technik byla vyvinuta a optimalizována GC metoda a metoda SPE prekoncentrace. I přes složitost problematiky tohoto typu optimalizace přinesly použité postupy výrazné zjednodušení práce a časovou úsporu. Z tohoto důvodu je možné považovat první dva vytýčené cíle práce za splněné.

Na základě výsledků dvou předchozích závislostí byla prokázána nevhodnost testované SPE prekoncentrace pro stanovení fluorotelomerních alkoholů o koncentracích nižších než 100 pg/mL ve vzorcích s objemem větším než 400 mL, a to z důvodu výrazného poklesu účinnosti extrakce. Z tohoto důvodu nebyly testovány reálné vzorky. Podrobnější testování limitů, či jiných podmínek SPE prekoncentrace, bude předmětem další práce.

7. Použitá literatura

1. Vanleeuwen, S. and J. Deboer
Extraction and clean-up strategies for the analysis of poly- and perfluoroalkyl substances in environmental and human matrices.
Journal of Chromatography A. **1153**:1-2, 172-185 (2007).
2. Ahrens, L., Z. Xie, and R. Ebinghaus
Distribution of perfluoroalkyl compounds in seawater from Northern Europe, Atlantic Ocean, and Southern Ocean.
Chemosphere. **78**:8, 1011-1016 (2010).
3. Guo, R., et al.
Evaluation of the fate of perfluoroalkyl compounds in wastewater treatment plants.
Water Research. **44**:11, 3476-3486 (2010).
4. Takagi, S., et al.
Fate of Perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate in drinking water treatment processes.
Water Research. **45**:13, 3925-3932 (2011).
5. Weinberg, I., A. Dreyer, and R. Ebinghaus
Landfills as sources of polyfluorinated compounds, polybrominated diphenyl ethers and musk fragrances to ambient air.
Atmospheric Environment. **45**:4, 935-941 (2011).
6. Sun, H., et al.
Long-chain perfluorinated chemicals in digested sewage sludges in Switzerland.
Environmental Pollution. **159**:2, 654-662 (2011).
7. Kunacheva, C., et al.
Mass flows of perfluorinated compounds (PFCs) in central wastewater treatment plants of industrial zones in Thailand.
Chemosphere. **83**:6, 737-744 (2011).
8. Clara, M., et al.
Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: An Austrian case study.
Water Research. **43**:18, 4760-4768 (2009).
9. Li, F., et al.
Perfluorinated compounds in Haihe River and Dagou Drainage Canal in Tianjin, China.
Chemosphere. **84**:2, 265-271 (2011).
10. Weinberg, I., A. Dreyer, and R. Ebinghaus
Waste water treatment plants as sources of polyfluorinated compounds, polybrominated diphenyl ethers and musk fragrances to ambient air.
Environmental Pollution. **159**:1, 125-132 (2011).

11. Cai, M., et al.
Spatial distribution of per- and polyfluoroalkyl compounds in coastal waters from the East to South China Sea.
Environmental Pollution. **161**, 162-169 (2012).
12. Domingo, J.L.
Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds.
Environment International. **40**, 187-195 (2012).
13. Haug, L.S., et al.
Characterisation of human exposure pathways to perfluorinated compounds — Comparing exposure estimates with biomarkers of exposure.
Environment International. **37**:4, 687-693 (2011).
14. Taniyasu, S., et al.
A Survey of Perfluorooctane Sulfonate and Related Perfluorinated Organic Compounds in Water, Fish, Birds, and Humans from Japan.
Environmental Science & Technology. **37**:12, 2634-2639 (2003).
15. Llorca, M., et al.
Fate of a broad spectrum of perfluorinated compounds in soils and biota from Tierra del Fuego and Antarctica.
Environmental Pollution. **163**, 158-166 (2012).
16. Bengtson Nash, S., et al.
Perfluorinated compounds in the Antarctic region: Ocean circulation provides prolonged protection from distant sources.
Environmental Pollution. **158**:9, 2985-2991 (2010).
17. Cai, M., et al.
Per- and polyfluoroalkyl substances in snow, lake, surface runoff water and coastal seawater in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica.
Journal of Hazardous Materials. **209–210**:0, 335-342 (2012).
18. Taniyasu, S., et al.
Analysis of fluorotelomer alcohols, fluorotelomer acids, and short- and long-chain perfluorinated acids in water and biota.
Journal of Chromatography A. **1093**:1-2, 89-97 (2005).
19. Butt, C.M., et al.
Levels and trends of poly- and perfluorinated compounds in the arctic environment.
Science of The Total Environment. **408**:15, 2936-2965 (2010).
20. Lehmler, H.
Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants - a review.
Chemosphere. **58**:11, 1471-1496 (2005).

21. Szostek, B. and K. Prickett
Determination of 8:2 fluorotelomer alcohol in animal plasma and tissues by gas chromatography–mass spectrometry.
Journal of Chromatography B. **813**:1-2, 313-321 (2004).
22. Chu, S. and R.J. Letcher
Analysis of fluorotelomer alcohols and perfluorinated sulfonamides in biotic samples by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry.
Journal of Chromatography A. **1215**:1-2, 92-99 (2008).
23. Moon, H.-B., et al.
Perfluorinated compounds in minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) and long-beaked common dolphins (*Delphinus capensis*) from Korean coastal waters.
Marine Pollution Bulletin. **60**:7, 1130-1135 (2010).
24. Brandsma, S.H., et al.
Dietary exposure of rainbow trout to 8:2 and 10:2 fluorotelomer alcohols and perfluorooctanesulfonamide: Uptake, transformation and elimination.
Chemosphere. **82**:2, 253-258 (2011).
25. Liu, C., et al.
Effects of fluorotelomer alcohol 8:2 FTOH on steroidogenesis in H295R cells: Targeting the cAMP signalling cascade.
Toxicology and Applied Pharmacology. **247**:3, 222-228 (2010).
26. Fasano, W.J., et al.
Kinetics of 8-2 fluorotelomer alcohol and its metabolites, and liver glutathione status following daily oral dosing for 45 days in male and female rats.
Chemico-Biological Interactions. **180**:2, 281-295 (2009).
27. Martin, J.W., S.A. Mabury, and P.J. O'Brien
Metabolic products and pathways of fluorotelomer alcohols in isolated rat hepatocytes.
Chemico-Biological Interactions. **155**:3, 165-180 (2005).
28. Martin, J.W., et al.
Bioactivation of fluorotelomer alcohols in isolated rat hepatocytes.
Chemico-Biological Interactions. **177**:3, 196-203 (2009).
29. Henderson, W.M., et al.
Quantification of fluorotelomer-based chemicals in mammalian matrices by monitoring perfluoroalkyl chain fragments with GC/MS.
Journal of Chromatography B. **846**:1-2, 155-161 (2007).
30. Mahmoud, M., et al.
Polyfluorinated telomers in precipitation and surface water in an urban area of Japan.
Chemosphere. **74**:3, 467-472 (2009).

31. Szostek, B., K.B. Prickett, and R.C. Buck
Determination of fluorotelomer alcohols by liquid chromatography/tandem mass spectrometry in water.
Rapid Communications in Mass Spectrometry. **20**:19, 2837-2844 (2006).
32. Gauthier, S.A. and S.A. Mabury
Aqueous photolysis of 8:2 fluorotelomer alcohol.
Environmental Toxicology and Chemistry. **24**:8, 1837-1846 (2005).
33. Oono, S., et al.
Current levels of airborne polyfluorinated telomers in Japan.
Chemosphere. **73**:6, 932-937 (2008).
34. Kim, S.-K., et al.
Indoor and outdoor poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) in Korea determined by passive air sampler.
Environmental Pollution. **162**, 144-150 (2012).
35. Dreyer, A. and R. Ebinghaus
Polyfluorinated compounds in ambient air from ship- and land-based measurements in northern Germany.
Atmospheric Environment. **43**:8, 1527-1535 (2009).
36. Barber, J.L., et al.
Analysis of per- and polyfluorinated alkyl substances in air samples from Northwest Europe.
Journal of Environmental Monitoring. **9**:6, 530 (2007).
37. Dreyer, A., et al.
Optimized method avoiding solvent-induced response enhancement in the analysis of volatile and semi-volatile polyfluorinated alkylated compounds using gas chromatography–mass spectrometry.
Journal of Chromatography A. **1178**:1-2, 199-205 (2008).
38. Cai, M., et al.
Polyfluorinated compounds in the atmosphere along a cruise pathway from the Japan Sea to the Arctic Ocean.
Chemosphere. **87**:9, 989-997 (2012).
39. Shoeib, M., et al.
Survey of polyfluorinated chemicals (PFCs) in the atmosphere over the northeast Atlantic Ocean.
Atmospheric Environment. **44**:24, 2887-2893 (2010).
40. Shoeib, M., T. Harner, and P. Vlahos
Perfluorinated Chemicals in the Arctic Atmosphere.
Environmental Science & Technology. **40**:24, 7577-7583 (2006).

41. Jahnke, A., et al.
An improved method for the analysis of volatile polyfluorinated alkyl substances in environmental air samples.
Analytical and Bioanalytical Chemistry. **387**:3, 965-975 (2007).
42. Jahnke, A., et al.
Development and application of a simplified sampling method for volatile polyfluorinated alkyl substances in indoor and environmental air.
Journal of Chromatography A. **1164**:1-2, 1-9 (2007).
43. Liu, J., et al.
6-2 Fluorotelomer alcohol aerobic biodegradation in soil and mixed bacterial culture.
Chemosphere. **78**:4, 437-444 (2010).
44. Dasu, K., et al.
Hydrolysis of fluorotelomer compounds leading to fluorotelomer alcohol production during solvent extractions of soils.
Chemosphere. **81**:7, 911-917 (2010).
45. Wang, N., et al.
8-2 Fluorotelomer alcohol aerobic soil biodegradation: Pathways, metabolites, and metabolite yields.
Chemosphere. **75**:8, 1089-1096 (2009).
46. Ellington, J.J., et al.
Analysis of fluorotelomer alcohols in soils: Optimization of extraction and chromatography.
Journal of Chromatography A. **1216**:28, 5347-5354 (2009).
47. Sinclair, E., et al.
Quantitation of Gas-Phase Perfluoroalkyl Surfactants and Fluorotelomer Alcohols Released from Nonstick Cookware and Microwave Popcorn Bags.
Environmental Science & Technology. **41**:4, 1180-1185 (2007).
48. Fromme, H., et al.
Perfluorinated compounds – Exposure assessment for the general population in western countries.
International Journal of Hygiene and Environmental Health. **212**:3, 239-270 (2009).
49. Bezerra, M.A., et al.
Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.
Talanta. **76**:5, 965-977 (2008).
50. Ilzarbe, L., et al.
Practical applications of design of experiments in the field of engineering: a bibliographical review.
Quality and Reliability Engineering International. **24**:4, 417-428 (2008).

51. Ferreira, S., et al.
Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems.
Journal of Chromatography A. **1158**:1-2, 2-14 (2007).
52. Tye, H.
Application of statistical 'design of experiments' methods in drug discovery.
Drug Discovery Today. **9**:11, 485-491 (2004).
53. Alizadeh, T., Zare, M.
Enhancement of sensitivity of molecularly imprinted polymer based parathion voltammetric sensor by using experimental design techniques.
Analytical and bioanalytical electrochemistry. **1**:3, 169-187 (2009).
54. Vallejo, A., et al.
Optimization of large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry analysis for the determination of estrogenic compounds in environmental samples.
Journal of Chromatography A. **1217**:52, 8327-8333 (2010).
55. Lundstedt, T., et al.
Experimental design and optimization.
Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. **42**:1-2, 3-40 (1998).
56. Michálek, J.
Navrhování a vyhodnocování experimentů (DOE).
www.crr.vutbr.cz/system/files/brozura_05_1012_2.pdf. (staženo 14.2.2011).
57. Leardi, R.
Experimental design in chemistry: A tutorial.
Analytica Chimica Acta. **652**:1-2, 161-172 (2009).
58. Brereton, R.G.
Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant.
London. **John Wiley and sons** (2003).
59. Wang, J. and W. Wan
Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review.
International Journal of Hydrogen Energy. **34**:1, 235-244 (2009).
60. Čabala, R. and M. Bursová
Bell-shaped extraction device assisted liquid-liquid microextraction technique and its optimization using response-surface methodology.
Journal of Chromatography A. **1230**:0, 24-29 (2012).
61. Costa, N.R. and Z.L. Pereira
Multiple response optimization: a global criterion-based method.
Journal of Chemometrics. **24**:6, 333-342 (2010).